



Departamento de Bioquímica  
Facultad de Medicina  
**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID**

**ESTUDIO DE ALTERACIONES  
GENÉTICAS Y MOLECULARES EN  
CARCINOMAS DE PULMÓN NO  
MICROCÍTICOS EN EL CONTEXTO  
DE LAS TERAPIAS DIRIGIDAS EN  
CÁNCER**

Bárbara Angulo Biedma  
*Licenciada en Biología*

*Directores:*  
Dra. Montserrat Sánchez-Céspedes  
Dr. Fernando López-Ríos  
Dra. Esther Conde Gallego

Madrid, 2011





INSTITUT  
D'INVESTIGACIÓ  
BIOMÈDICA  
DE BELLVITGE

Dña Montse Sánchez Céspedes, Doctora en Biología, Jefe del Grupo *Genes y Cáncer*, del Programa de Epigenética y Biología del Cáncer (PEBC) dentro del Institut d'Investigacions Biomediques Bellvitge (IDIBELL) de Barcelona,

**CERTIFICA:**

Que Dña. Bárbara Angulo Biedma, Licenciada en Biología, ha realizado bajo mi dirección el trabajo titulado **“Estudio de alteraciones genéticas y moleculares en carcinomas de pulmón no microcíticos en el contexto de las terapias dirigidas en cáncer”**. Doy mi conformidad para su presentación y defensa como Tesis Doctoral, tras examinar y revisar dicho trabajo.

Y para que así conste, a los efectos oportunos, firmo el presente certificado, en Barcelona a 2 de noviembre de dos mil once.

Fdo: Montse Sánchez Céspedes





D. Fernando López-Ríos, Doctor en Medicina y Cirugía, Jefe de Anatomía Patológica y del Laboratorio de Dianas Terapéuticas del Hospital HM Universitario Sanchinarro de Madrid,

**CERTIFICA:**

Que Dña. Bárbara Angulo Biedma, Licenciada en Biología, ha realizado bajo mi dirección el trabajo titulado **“Estudio de alteraciones genéticas y moleculares en carcinomas de pulmón no microcíticos en el contexto de las terapias dirigidas en cáncer”**. Doy mi conformidad para su presentación y defensa como Tesis Doctoral, tras examinar y revisar dicho trabajo.

Y para que así conste, a los efectos oportunos, firmo el presente certificado, en Madrid a 2 de noviembre de dos mil once.

Fdo: Fernando López-Ríos



Dña. Esther Conde Gallego, Doctora en Medicina y Cirugía, Médico Adjunto de Anatomía Patológica y del Laboratorio de Dianas Terapéuticas del Hospital HM Universitario Sanchinarro de Madrid,

**CERTIFICA:**

Que Dña. Bárbara Angulo Biedma, Licenciada en Biología, ha realizado bajo mi dirección el trabajo titulado **“Estudio de alteraciones genéticas y moleculares en carcinomas de pulmón no microcíticos en el contexto de las terapias dirigidas en cáncer”**. Doy mi conformidad para su presentación y defensa como Tesis Doctoral, tras examinar y revisar dicho trabajo.

Y para que así conste, a los efectos oportunos, firmo el presente certificado, en Madrid a 2 de noviembre de dos mil once.

Fdo: Esther Conde Gallego





*A mis padres*



## AGRADECIMIENTOS

Han sido muchas las personas que con sus conocimientos, consejos y ánimos han colaborado en la realización de esta tesis. A todas ellas quiero expresar mi más sincero agradecimiento. De modo especial quiero dar las gracias:

A la Dra. Montserrat Sánchez-Céspedes, por darme mi primera oportunidad profesional en el ámbito de la investigación molecular en cáncer. Formar parte de su grupo me permitió aprender y darme cuenta de que había encontrado mi camino. Los años compartidos sirvieron de aliciente y punto de partida para la realización de mis estudios de doctorado y del presente trabajo de tesis.

Al Dr. Fernando López-Ríos, por su confianza en mí para unirme a su proyecto y hacerme sentir como uno más. Por darme la oportunidad de “redecorar” mi carrera y ofrecerme tantas opciones para realizarme profesionalmente. Por su tenacidad y ayuda en el desarrollo de este proyecto, y permitirme la libertad para, en los últimos momentos, dedicarme casi en exclusividad a él, sin ello difícilmente podría haber llegado a su fin.

A la Dra. Esther Conde, por su seguimiento cercano y por sus buenos consejos en la realización de esta tesis y en el día a día. Después de tantos años compartidos, siempre agradezco su apoyo para hacer más llevadero el camino cuando se pone cuesta arriba.

A la Dra. Ruth Gil Prieto, que en el último momento nos prestó una inestimable ayuda en la realización del análisis estadístico, sin ella no habría sido posible. Y al Dr. Carlos Gómez, por facilitarnos este contacto tan necesario.

A Ana, Carlos y Myriam, porque gente como ellos enriquece y se convierte en más que compañeros, por hacer que venir al laboratorio cada día sea algo más que venir al trabajo. Al resto de mis compañeros del Laboratorio de Dianas Terapéuticas. En especial a Rebeca, porque ella mejor que nadie sabe que mis primeros momentos aquí fueron duros; y a Marga, porque su buen trabajo en estos últimos meses permitió que pudiera dedicarme a finalizar este proyecto.

A mis compañeros del Grupo de Cáncer de Pulmón y del Programa de Patología Molecular del CNIO, con los años mantengo el recuerdo de haber pertenecido a una gran familia en la que siempre encontrabas una buena cara dispuesta a ayudar. En especial a Raquel, Sandra y Moying, por todo lo que aprendimos durante los largos años compartidos, en lo profesional y en lo

personal, y por lo mucho que nos reímos. Aún sigo echándolas de menos. Y no me olvido de los chicos del grupo, de Pedro, Julián y Salva, siempre dispuestos a ayudar.

A mis padres, por creer siempre que lo mejor que podían dejarnos a mi hermana y a mí era una buena educación, y por todos los sacrificios que tuvieron que hacer por conseguirlo. Su ejemplo creó en mí el afán de superación necesario para embarcarme en este proyecto. A Ruth, por estar siempre ahí y apoyarme en todo.

A Nacho. Sé que no quería figurar en los agradecimientos porque siempre dice que no puede ayudarme mucho en mi trabajo, que la ciencia es muy complicada para él. Pero si algo he aprendido con él después de tantos años es que tener a tu lado a una persona que te quiere y te apoya, se refleja en todos los aspectos de la vida y hace que muchas más cosas sean posibles. Por eso, esta tesis también se la debo a él y a su teoría del segundo decisivo. Por ser capaz de sacar tantas cosas buenas de mí y hacerme reír siempre. Y porque juntos nos hemos embarcado en el proyecto más importante de nuestras vidas: nuestro hijo.

El trabajo que se presenta a continuación ha sido parcialmente financiado por la Fundación Mutua Madrileña y por el Fondo de Investigaciones Sanitarias (Investigadores principales: Esther Conde, Luis Paz-Ares y Fernando López-Ríos)

## **JUSTIFICACIÓN**



El cáncer de pulmón es, en el momento actual, el tumor maligno más frecuente y más letal en el mundo occidental. A pesar de los avances que se han logrado en el conocimiento de la biología molecular de estos tumores, el pronóstico sigue siendo muy pobre y la supervivencia global a los cinco años no supera el 15%.

En general, los esfuerzos actuales para mejorar la supervivencia de los pacientes con cáncer se centran en el desarrollo de nuevos tratamientos, concretamente, de terapias dirigidas contra vías de señalización que son claves en la carcinogénesis y que se encuentran desreguladas como consecuencia de alteraciones moleculares que afectan a algunos de los componentes de las mismas. El ejemplo más representativo del éxito de estas terapias en cáncer de pulmón lo constituye el desarrollo de inhibidores tirosina quinasa (ITKs) dirigidos contra el receptor EGFR y la identificación de la asociación de la respuesta a estos inhibidores con la presencia de mutaciones en el gen *EGFR*. Así, hoy en día, la determinación de mutaciones en *EGFR* se considera esencial en la práctica clínica a la hora de decidir las opciones terapéuticas de un paciente con un carcinoma de pulmón no microcítico (NSCLC, del inglés *non small cell lung carcinoma*), siendo además una información relevante en el diseño de ensayos clínicos prospectivos. Este ejemplo evidencia además la importancia de conocer las alteraciones genéticas en el contexto de las terapias dirigidas, ya que dichas alteraciones afectan mayoritariamente a proteínas que son dianas de los agentes dirigidos y lo que es quizás más relevante, pueden representar marcadores predictivos que permitan identificar a los pacientes que van a responder a estos tratamientos.

La respuesta a ITKs en pacientes diagnosticados de cáncer de pulmón portadores de mutaciones en el gen *EGFR* representa, sin lugar a duda, el mayor avance terapéutico en cáncer de pulmón de la última década y reproduce el éxito de los agentes terapéuticos dirigidos observado en otros tipos de tumores sólidos como los carcinomas de mama con amplificación en el gen *HER2* o los tumores del estroma gastrointestinal con mutaciones en el gen *C-KIT*, entre otros. Desgraciadamente, ya desde el momento en que se describieron por primera vez, se constató que estas mutaciones afectan a solo un 10-15% de los pacientes diagnosticados de NSCLCs, definiendo así a un subgrupo distintivo desde el punto de vista molecular dentro de los carcinomas de pulmón. Los avances en el conocimiento de las alteraciones genéticas relevantes para la carcinogénesis pulmonar están haciendo que otras dianas prometedoras emerjan. Se han identificado otros oncogenes alterados por mutaciones, amplificación génica o translocaciones (*KRAS*, *BRAF*, *PIK3CA*, *MET*, *ALK*, entre otros) que, al crear una dependencia oncogénica en el tumor, pueden relacionarse con la respuesta a fármacos dirigidos ya disponibles en la clínica o que están en fase de desarrollo. De acuerdo con el paradigma que representa *EGFR*, el reconocimiento de subgrupos de carcinomas de pulmón definidos por una alteración molecular distintiva es sumamente relevante ya que puede conducir a una mejora sustancial en el resultado de los tratamientos.

En la actualidad, las dianas terapéuticas o marcadores predictivos que se contemplan en la clínica corresponden a una única alteración genética por tipo de tumor y este abordaje no siempre refleja la complejidad molecular de los tumores, en los que la activación o inactivación de vías de señalización se producen como consecuencia de múltiples alteraciones genéticas más que de una sola. En este sentido, el análisis global de los perfiles de expresión génica tiene enorme relevancia en la medida que permite, por ejemplo, identificar las firmas genéticas asociadas con alteraciones en genes concretos, estando estas firmas constituidas por marcadores que podrían ser explotados terapéuticamente.

A la hora de trasladar el estudio de marcadores predictivos a la clínica resulta imprescindible disponer de un método sensible y específico para caracterizar las alteraciones genéticas subyacentes. En este sentido, es significativo analizar la situación que se está viviendo en el análisis de las mutaciones en el gen *EGFR*, ya que pasados cerca de siete años desde que se describieran por primera vez y a pesar del impacto clínico para los pacientes con cáncer de pulmón, aún no se dispone de un método estandarizado que se utilice de forma universal para seleccionar a los pacientes candidatos a recibir una terapia basada en ITKs dirigidos contra EGFR.

Éste es el trasfondo en el que llevo desarrollando mi carrera profesional y en el que he realizado la presente tesis. Ante la necesidad de desarrollar tratamientos dirigidos específicamente frente a dianas moleculares, es necesario avanzar en el conocimiento del catálogo completo de alteraciones genéticas características de los distintos tipos de tumores. Por ello, la primera parte de mi trabajo doctoral puede considerarse una etapa de descubrimiento y se ha centrado en la búsqueda, mediante el análisis global de la expresión génica, de nuevos marcadores relevantes para la carcinogénesis pulmonar que, por su valor diagnóstico, pronóstico o predictivo, puedan ser trasladados a la clínica. Además, gracias a mi trabajo en el Laboratorio de Dianas Terapéuticas del Hospital HM Universitario Sanchinarro, he podido constatar que la clave para personalizar el tratamiento de los pacientes oncológicos está en el estudio de las alteraciones genéticas que, o bien son dianas terapéuticas o marcadores predictivos reconocidos en distintos tipos de tumores al existir fármacos aprobados para su uso en la clínica, o bien pueden representar potenciales dianas o marcadores de respuesta ya que su alteración se relaciona con el desarrollo de estos tumores, pudiendo guiar así el desarrollo de nuevos agentes dirigidos. Resulta, por tanto, imprescindible establecer la frecuencia real de estas alteraciones en series clínicas y, por ello, como parte de una segunda etapa de traslado a la clínica, en la presente tesis se ha realizado un estudio de las principales dianas terapéuticas o marcadores predictivos que se contemplan en la actualidad en cáncer de pulmón, con el objetivo de establecer su incidencia y el contexto molecular y clínico en el que aparecen. Por último, es necesario investigar el mejor método para caracterizar estas alteraciones. A finales del año 2004, como miembro del Grupo de Cáncer de Pulmón del Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas, participé en la implementación de una de las primeras



pruebas para el análisis de mutaciones en el gen *EGFR*, poco tiempo después del descubrimiento de su valor para los pacientes con cáncer de pulmón. Desde entonces han sido patentes las limitaciones metodológicas que existen en la práctica clínica para caracterizar alteraciones genéticas con valor predictivo. Parte de mi trabajo se centra, por tanto, en la evaluación de distintos métodos que permitan un análisis preciso de las alteraciones genéticas y moleculares relevantes desde el punto de vista terapéutico, con el fin de evaluar en el entorno clínico real su sensibilidad, especificidad y puesta en práctica. En consecuencia, en la presente tesis se planteó un estudio comparativo de tres métodos para la determinación de mutaciones en el gen *EGFR*, el marcador predictivo más relevante en cáncer de pulmón con el fin de reflejar esta problemática tan actual en el contexto de las terapias dirigidas.

A continuación se muestran las publicaciones y comunicaciones a congresos en las que he participado en los últimos años, destacando aquéllos que recogen algunos de los resultados de la presente tesis doctoral (●):

López-Ríos F, **Angulo B**, Gómez B, Mair D, Martínez R, Shieh F, Vaks J, Langland R, Lawrence HJ, González de Castro D. Comparison of molecular testing methods for the detection of BRAF V600E mutations in formalin-fixed paraffin-embedded tissue (FFPET) specimens of malignant melanoma (póster). 23<sup>rd</sup> European Congress of Pathology, Helsinki 2011.

- **Angulo B**, Conde E, Suárez-Gauthier A, García-Luján R, Sánchez-Céspedes M, López-Encuentra A, Paz-Ares L, López-Ríos F. PIK3CA alterations in lung squamous cell carcinomas: role for mutations and amplification (comunicación oral). 14<sup>th</sup> World Conference on Lung Cancer, Amsterdam 2011.

- Conde E, **Angulo B**, Suárez-Gauthier A, García-Lujan R, López-Encuentra A, Paz Ares L, López-Ríos F. Assessment of MET amplification in non-small cell lung carcinomas by SISH: correlation with EGFR and KRAS mutations in early stages (póster). 14<sup>th</sup> World Conference on Lung Cancer, Amsterdam 2011.

**Angulo B**, Conde E, Martínez R, Rubio-Viqueira B, López-Ríos F. Analytic performance of a novel real-time PCR method for the detection of mutations in EGFR in formalin-fixed paraffin-embedded tissue (FFPET) samples of lung cancer (poster). 14<sup>th</sup> World Conference on Lung Cancer, Amsterdam 2011.

García-García E, Gómez-Martín C, **Angulo B**, Conde E, Suárez-Gauthier A, Adrados M, Perna C, Rodríguez-Peralto JL, Hidalgo M, López-Ríos F. Hybridization for human epidermal growth factor receptor 2 testing in gastric carcinoma: a comparison of fluorescence in-situ hybridization with a novel fully automated dual-colour silver in-situ hybridization method. *Histopathology* 2011; 59: 8-17.

- Conde E, **Angulo B**, Redondo P, Toldos O, García-García E, Suárez-Gauthier A, Rubio-Viqueira B, Marrón C, García-Luján R, Sánchez-Céspedes M, López-Encuentra A, Paz-Ares L, López-Ríos F. The use of P63 immunohistochemistry for the identification of squamous cell carcinoma of the lung. PLoS One 2010; 5: e12209.

Castillo SD, **Angulo B**, Suárez-Gauthier A, Melchor L, Medina PP, Sánchez-Verde L, Torres-Lanzas J, Pita G, Benitez J, Sánchez-Céspedes M. Gene Amplification of the transcription factor DP1 and the CTNND1 in human lung cancer. J Pathol 2010; 222: 119-123.

**Angulo B**, García-García E, Martínez R, Suárez-Gauthier A, Conde E, Hidalgo M, López-Ríos F. A commercial real-time PCR Kit provides greater sensitivity than direct sequencing to detect KRAS mutations: a morphology-based approach in colorectal carcinoma. J Mol Diagn 2010; 12: 292-299.

- **Angulo B**, Conde E, Martínez R, Suárez-Gauthier A, García-García E, Rubio-Viqueira B, López-Ríos F. Comparison of direct sequencing and a commercial real-time PCR kit for detection of mutation in *EGFR* (póster). 13<sup>th</sup> World Conference on Lung Cancer, San Francisco 2009.

- Conde E, **Angulo B**, Redondo P, García-García E, Suárez-Gauthier A, García Luján R, López-Encuentra A, Paz-Ares L, López-Ríos F. Value of P63 in distinguishing squamous cell carcinoma from adenocarcinoma of the lung (póster). 13<sup>th</sup> World Conference on Lung Cancer, San Francisco 2009.

Blanco R, Iwakawa R, Tang M, Kohno T, **Angulo B**, Pio R, Montuenga LM, Minna JD, Yokota J, Sánchez-Céspedes M. A gene-alteration profile of human lung cancer cell-lines. Hum Mut 2009; 30: 1119-1206.

- **Angulo B**, Suárez-Gauthier A, López-Ríos F, Medina P.P, Conde E, Tang M, Soler G, López-Encuentra A, Cigudosa J.C, Sánchez-Céspedes M. Expression signatures in lung cancer reveal a profile for EGFR-mutant tumours and identify selective PIK3CA overexpression by gene amplification. J Pathol 2008; 214: 347-356. Premio “Highly Commended” por The *Journal of Pathology* Jeremy Jass Prize for Research Excellence in Pathology.

Conde E, **Angulo B**, Tang M, Morente M, Torres-Lanzas J, López-Encuentra A, López-Ríos F, Sánchez-Céspedes M. Molecular context of the EGFR mutations: evidence for the inactivation of mTOR/S6K signalling. Clin Cancer Res 2006; 12: 710-717.

- **Angulo B**, Conde E, Tang M, Carretero J, Medina P.P, López-Ríos F, Sánchez-Céspedes M. Global expression profiling of lung primary tumors: correlation with pathological and genetics characteristics (comunicación oral). 11<sup>th</sup> World Conference on Lung Cancer. Barcelona 2005.

Medina P.P, Carretero J, Ballestar E, **Angulo B**, López-Ríos F, Esteller M, Sánchez-Céspedes M. Transcriptional targets of the chromatin-remodelling factor SMARCA4/BRG1 in lung cancer cells. Hum Mol Genet 2005; 14: 973-982.



## **RESUMEN**



En la actualidad, el desarrollo de las terapias dirigidas frente a vías de señalización que son claves para el desarrollo de los distintos tipos de tumores está suponiendo una mejora significativa en el manejo clínico del paciente oncológico. Además, está planteando nuevos retos para la investigación molecular en cáncer. Su éxito requiere, en primer lugar, un diagnóstico histológico reproducible ya que muchos de los agentes disponibles muestran una mayor actividad en tumores con un tipo histológico concreto al que se asocian las alteraciones genéticas que son dianas de dichos fármacos. En segundo lugar, precisa definir las alteraciones genéticas relevantes para cada tipo tumoral, estableciendo el tipo y frecuencia, su contexto molecular y su relación con la evolución clínica del paciente, con el fin de evaluar su posible valor pronóstico y predictivo. Por último, plantea la necesidad de disponer de métodos de análisis sensibles y específicos que permitan identificar a los pacientes portadores de dichas alteraciones y que con mayor probabilidad van a responder al fármaco en cuestión.

Con el objetivo de identificar las firmas genéticas o marcadores que pudieran relacionarse con la histología de los NSCLCs o con alteraciones en genes relevantes para la carcinogénesis pulmonar, se realizó un análisis de expresión génica mediante *microarrays* en una serie de NSCLCs. Se identificaron genes diferencialmente expresados entre carcinomas epidermoides (SCC, del inglés *squamous cell carcinoma*) y adenocarcinomas (AC, del inglés *adenocarcinoma*), entre los que se incluían algunos previamente caracterizados, como P63, y otros nuevos, como DSC3 o PKP1. En relación con las alteraciones genéticas, el hallazgo más significativo fue la identificación de una marcada sobreexpresión de *PIK3CA*, debida a su amplificación génica, siendo ésta una alteración característica de SCCs.

Con el objetivo de validar algunas de las observaciones más relevantes derivadas del estudio de *microarrays*, se confirmó sobre una serie independiente de NSCLCs en estadios iniciales la utilidad de la tinción inmunohistoquímica (IHQ) de P63 para contribuir al diagnóstico diferencial de los NSCLCs al mejorar significativamente la identificación precisa de SCCs. Sobre esta serie se realizó además un completo análisis de los principales genes que se encuentran alterados en cáncer de pulmón, y que son considerados dianas o marcadores predictivos de fármacos ya aprobados o que están en fase de desarrollo, como *EGFR*, *KRAS*, *BRAF*, *PIK3CA*, *MET* o *IGF-1R*. Entre los hallazgos más significativos de este análisis se encuentran la confirmación de la naturaleza mutuamente excluyente de las mutaciones en los genes *EGFR* (5.9%), *KRAS* (13.7%) y *BRAF* (4.1%) en NSCLCs; la prevalencia de la amplificación del gen *PIK3CA* como alteración característica de los SCCs (38%); y la identificación de la amplificación del gen *MET* en una pequeña proporción de NSCLCs (4.6%), pudiendo presentarse dicha alteración tanto en ACs como en SCCs. En relación con su significado pronóstico, se puede destacar que tanto la presencia de la amplificación en el gen *PIK3CA* como en el gen *MET* identificaron subgrupos de carcinomas con una tendencia a presentar un peor pronóstico, si bien las diferencias no fueron significativamente estadísticas. Por su parte, los SCCs con expresión de

IGF-1R presentaron una tendencia, no estadísticamente significativa, a una mayor supervivencia global en comparación con los SCCs negativos para IGF-1R.

Por último, ante las limitaciones metodológicas que existen en la práctica clínica para caracterizar alteraciones genéticas con valor predictivo, se planteó un estudio comparativo de tres de los métodos disponibles para el análisis de mutaciones en el gen *EGFR*, el marcador predictivo más relevante en cáncer de pulmón: secuenciación directa del producto de PCR (reacción en cadena de la polimerasa, del inglés *polymerase chain reaction*), PCR cuantitativa en tiempo real e IHQ. El análisis basado en PCR cuantitativa en tiempo real ofreció la mayor sensibilidad, al permitir la detección de mutaciones en *EGFR* cuando el ADN mutado sólo representaba el 5% con respecto al ADN total analizado. Por su parte, el uso de anticuerpos específicos para la detección de las dos mutaciones más prevalentes en el gen *EGFR*, la delección E746-A750 en el exón 19 y la mutación puntual L858R en el exón 21, ofreció una especificidad del 100% para el análisis inmunohistoquímico de ambas alteraciones. Globalmente, los resultados de este estudio comparativo demuestran que un abordaje basado en la morfología es esencial para estandarizar la fase pre-analítica del estudio de mutaciones somáticas y asegurar la sensibilidad óptima de la fase analítica.

En conclusión, este trabajo aporta información que contribuye a un mejor conocimiento de las alteraciones moleculares tratables en la práctica clínica diaria en cáncer de pulmón, lo que sin duda se traducirá en mejores tratamientos para estos pacientes.



Significant improvement is currently underway in the clinical treatment of cancer patients. This is due to the development of targeted therapies directed against those signalling pathways that are key to the development of different types of tumours. This development is also presenting new challenges for molecular research into cancer. Firstly, its success depends on a reproducible histological diagnosis. Many of the available agents show a higher level of activity in tumours with a specific histological type associated with the genetic alterations which such treatments target. Secondly, it is necessary to define the relevant genetic alterations for each tumour type. This means establishing the type and frequency, its molecular context, and its relation to the clinical evolution of the patient in order to assess its potential prognostic and predictive value. Finally, it creates a need for the availability of sensitive and specific methods of analysis which allow identification of those patients who are carriers of such alterations and who are more likely to respond to the treatment in question.

An analysis of genetic expression was conducted using microarrays on a series of non-small lung cancer (NSCLCs) tumours. The aim was to identify genetic signatures or markers which could be associated with NSCLC histology or with alterations in relevant genes in lung carcinogenesis. Differentially expressed genes between squamous cell carcinomas (SCCs) and adenocarcinomas (ACs) were identified, including some previously defined, such as *P63*, and other new ones such as *DSC3* and *PKP1*. With regard to the genetic alterations, the most significant finding was the identification of a marked overexpression of *PIK3CA*, owing to its gene amplification. This alteration was characteristic of SCCs.

In order to validate some of the more relevant observations arising from the microarray study, the value of immunohistochemistry (IHC) staining of P63 to contribute to the differential diagnosis of NSCLC by significantly enhancing the precise identification of SCCs was confirmed in an independent series of early stage NSCLCs. In addition, a complete analysis of the main genes found altered in lung cancer, such as *EGFR*, *KRAS*, *BRAF*, *PIK3CA*, *MET* and *IGF-1R*, was conducted on this series. These genes represent therapeutic targets, or predictive markers, of treatments either previously approved or in the development phase. The following can be considered among the most significant findings of this analysis: confirmation of the mutually exclusive nature of the mutations in genes *EGFR* (5.9%), *KRAS* (13.7%) and *BRAF* (4.1%) in NSCLCs; prevalence of amplification of the *PIK3CA* gene as a alteration characteristic of SCCs (38%); and identification of the amplification of the *MET* gene in a small proportion of NSCLCs (4.6%), including both ACs and SCCs. Regarding prognostic value, it was notable that the presence of amplification in both the *PIK3CA* and the *MET* genes identified subgroups of carcinomas with a tendency to present a worse prognosis, although the differences were not statistically significant. In the case of SCCs with IGF-1R expression, these tumours presented a tendency, not statistically significant, to a greater overall survival rate in comparison with SCCs which were negative for IGF-1R.

Finally, taking into account the methodological limitations which exist in clinical practice for characterizing genetic alterations with predictive value, a comparative study of three of the methods (direct sequencing, real-time quantitative PCR and IHC) available for analyzing mutations in the *EGFR* gene, the most important predictive marker in lung cancer, was performed. The analysis based on real time quantitative PCR offered the greatest sensitivity, allowing detection of mutations in *EGFR* when the mutated DNA represented only 5% of the total DNA analyzed. The use of specific antibodies to detect the two most prevalent mutations in the *EGFR* gene, E746-A750 deletion at exon 19 and L858R point mutation at exon 21, gave a specificity of 100% for immunohistochemical analysis of the two alterations. Overall, the results of this comparative study show that a morphology-based approach is essential for standardizing the pre-analytical phase in the study of somatic mutations and for ensuring optimum sensitivity in the analytical phase.

In conclusion, this work supplies data which contributes to a better understanding of treatable molecular alterations in daily clinical practice. These findings could improve the treatments for lung cancer patients.

# INDICE

JUSTIFICACIÓN.....	I
RESUMEN.....	IX
LISTADO DE ABREVIATURAS.....	1
1. INTRODUCCIÓN.....	3
1.1. GENERALIDADES DEL CÁNCER DE PULMÓN.....	5
<b>1.1.1. Epidemiología del cáncer de pulmón.....</b>	<b>5</b>
<b>1.1.2. Anatomía Patológica del cáncer de pulmón.....</b>	<b>6</b>
<b>1.1.3. Biología molecular del cáncer de pulmón .....</b>	<b>7</b>
1.2. DIANAS TERAPÉUTICAS Y MARCADORES PREDICTIVOS EN CÁNCER.....	11
<b>1.2.1. Estrategias terapéuticas en cáncer.....</b>	<b>11</b>
<b>1.2.2. Terapias convencionales no dirigidas versus terapias dirigidas: dianas terapéuticas .....</b>	<b>12</b>
<b>1.2.3. Biomarcadores en cáncer: la evolución de los marcadores predictivos .....</b>	<b>14</b>
1.3. DIANAS TERAPÉUTICAS Y MARCADORES PREDICTIVOS EN CÁNCER DE PULMÓN .....	18
<b>1.3.1. El valor predictivo de la histología en cáncer pulmón .....</b>	<b>18</b>
<b>1.3.2. Dianas terapéuticas y marcadores predictivos en carcinomas de pulmón no microcíticos.....</b>	<b>20</b>
1.4. APROXIMACIONES METODOLÓGICAS AL ESTUDIO DE MARCADORES PREDICTIVOS EN CÁNCER: ANÁLISIS DE MUTACIONES EN EGFR EN CÁNCER DE PULMÓN .....	22
2. OBJETIVOS.....	25
3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	29
3.1. ANÁLISIS DE PERFILES DE EXPRESIÓN GÉNICA EN CARCINOMAS DE PULMÓN NO MICROCÍTICOS.....	31
<b>3.1.1. Selección de casos .....</b>	<b>31</b>
<b>3.1.2. Extracción de ácidos nucleicos .....</b>	<b>31</b>
<b>3.1.3. Estudio de la expresión génica mediante <i>microarrays</i>.....</b>	<b>32</b>
<b>3.1.4. Análisis de mutaciones .....</b>	<b>33</b>
<b>3.1.5. PCR cuantitativa en tiempo real.....</b>	<b>34</b>

---

3.1.6.	Construcción de matrices tisulares.....	35
3.1.7.	Análisis inmunohistoquímico.....	35
3.1.8.	Hibridación in situ fluorescente.....	36
3.1.9.	Análisis estadístico .....	37
3.2.	ESTUDIO DE DIANAS TERAPÉUTICAS Y MARCADORES PREDICTIVOS EN CARCINOMAS DE PULMÓN NO MICROCÍTICOS .....	37
3.2.1.	Selección de casos.....	37
3.2.2.	Reclasificación histológica.....	38
3.2.3.	Extracción de ácidos nucleicos.....	39
3.2.4.	Análisis de dianas terapéuticas y marcadores predictivos.....	39
3.2.4.1.	Estudio de alteraciones de secuencia.....	40
3.2.4.2.	Estudio de alteraciones en el número de copias.....	41
3.2.4.3.	Estudio de alteraciones en los niveles de expresión proteica.....	43
3.2.5.	Análisis estadístico .....	43
3.3.	APROXIMACIONES METODOLÓGICAS AL ESTUDIO DE MARCADORES PREDICTIVOS EN CÁNCER: ANÁLISIS DE MUTACIONES EN EGFR EN CÁNCER DE PULMÓN.....	44
3.3.1.	Selección de casos.....	44
3.3.2.	Estudio de mutaciones en <i>EGFR</i> : metodologías .....	44
3.3.2.1.	Estudio de mutaciones en <i>EGFR</i> mediante en secuenciación directa del producto de PCR .....	45
3.3.2.2.	Estudio de mutaciones en <i>EGFR</i> mediante PCR cuantitativa en tiempo real .....	45
3.3.2.3.	Estudio de mutaciones en <i>EGFR</i> mediante inmunohistoquímica... ..	46
3.3.3.	Estudio de sensibilidad .....	47
4.	RESULTADOS.....	51
4.1.	ANÁLISIS DE PERFILES DE EXPRESIÓN GÉNICA EN CARCINOMAS DE PULMÓN NO MICROCÍTICOS .....	53
4.1.1.	Análisis no supervisado: estudio de la agrupación de los tumores en función de los perfiles de expresión génica .....	53
4.1.2.	Análisis supervisado I: estudio de firmas genéticas asociadas con la histología de los carcinomas de pulmón no microcíticos.....	54
4.1.3.	Análisis supervisado II: estudio de firmas genéticas características de alteraciones en genes relevantes en carcinomas de pulmón no microcíticos .....	56

---

---

4.1.4. Análisis de la sobreexpresión y la amplificación del gen <i>PIK3CA</i> .....	59
4.1. ESTUDIO DE DIANAS TERAPÉUTICAS Y MARCADORES PREDICTIVOS EN CARCINOMAS DE PULMÓN NO MICROCÍTICOS.....	63
4.2.1. Valor de la expresión proteica de P63 en la clasificación histológica de los carcinomas de pulmón no microcíticos.....	63
4.2.2. Análisis de dianas terapéuticas y marcadores predictivos en carcinomas de pulmón no microcíticos .....	64
4.2.2.1. Estudio de alteraciones de secuencia .....	64
4.2.2.2. Estudio de alteraciones en el número de copias .....	68
4.2.2.3. Estudio de alteraciones en los niveles de expresión proteica .....	74
4.2. APROXIMACIONES METODOLÓGICAS AL ESTUDIO DE MARCADORES PREDICTIVOS EN CÁNCER: ANÁLISIS DE MUTACIONES EN EGFR EN CÁNCER DE PULMÓN .....	77
4.3.1. Estudio de mutaciones en <i>EGFR</i> mediante secuenciación directa del producto de PCR .....	77
4.3.2. Estudio de mutaciones en <i>EGFR</i> mediante PCR cuantitativa en tiempo real .....	79
4.3.3. Estudio de mutaciones en <i>EGFR</i> mediante inmunohistoquímica.....	80
4.3.4. Estudio de sensibilidad .....	83
5. DISCUSIÓN .....	87
5.1. ANÁLISIS DE PERFILES DE EXPRESIÓN GÉNICA EN CARCINOMAS DE PULMÓN NO MICROCÍTICOS.....	89
5.1.1. Identificación de firmas genéticas asociadas con la histología de los carcinomas de pulmón no microcíticos .....	89
5.1.2. Identificación de firmas genéticas asociadas con alteraciones en genes relevantes en carcinomas de pulmón no microcíticos.....	90
5.2. ESTUDIO DE DIANAS TERAPÉUTICAS Y MARCADORES PREDICTIVOS EN CARCINOMAS DE PULMÓN NO MICROCÍTICOS.....	92
5.2.1. Valor de la expresión proteica de P63 en la clasificación histológica de los carcinomas de pulmón no microcíticos.....	92
5.2.2. Estudio de dianas terapéuticas y marcadores predictivos en carcinomas de pulmón no microcíticos .....	94
5.2.2.1. EGFR .....	94
5.2.2.2. KRAS .....	96

---

5.2.2.3. BRAF .....	97
5.2.2.4. PIK3CA .....	99
5.2.2.5. MET .....	102
5.2.2.6. IGF-1R .....	105
5.3. APROXIMACIONES METODOLÓGICAS AL ESTUDIO DE MARCADORES PREDICTIVOS EN CÁNCER: ANÁLISIS DE MUTACIONES EN EGFR EN CÁNCER DE PULMÓN.....	107
6. CONCLUSIONES .....	113
BIBLIOGRAFÍA .....	117
APÉNDICES.....	141
ARTÍCULOS PUBLICADOS .....	151

---

## LISTADO DE ABREVIATURAS

<b>AC:</b>	adenocarcinoma (del inglés, <i>adenocarcinoma</i> )
<b>ARMS:</b>	del inglés, <i>amplified refractory mutation system</i>
<b>BAC:</b>	cromosoma artificial bacteriano (del inglés, <i>bacterial artificial chromosome</i> )
<b>CC1:</b>	del inglés, <i>cell conditioning 1</i>
<b>CGH:</b>	hibridación genómica comparada (del inglés, <i>comparative genomic hybridization</i> )
<b>COLD-PCR:</b>	PCR a baja temperatura de desnaturalización (del inglés, <i>co-amplification at lower denaturation temperatura-PCR</i> )
<b>Ct:</b>	ciclo umbral de amplificación (del inglés, <i>cycle threshold</i> )
<b>DAB:</b>	3', 3'-diaminobencidina
<b>DAPI:</b>	4', 6'-diamino-2-fenilindol diclorohidrato
<b>DE:</b>	desviación estándar
<b>DNP:</b>	dinitrofenol
<b>FDR:</b>	tasa de falsos positivos (del inglés, <i>false discovery rate</i> )
<b>FFPE:</b>	fijado en formol e incluido en parafina (del inglés, <i>formalin-fixed paraffin embedded</i> )
<b>FISH:</b>	hibridación in situ fluorescente (del inglés, <i>fluorescent in situ hybridization</i> )
<b>GIST:</b>	tumor del estroma gastrointestinal
<b>H&amp;E:</b>	hematoxilina y eosina
<b>IHQ:</b>	inmunohistoquímica
<b>ITK:</b>	inhibidor tirosina quinasa (del inglés, <i>tyrosine kinase inhibitor</i> )
<b>LCC:</b>	carcinoma de células grandes (del inglés, <i>large cell carcinoma</i> )
<b>LCM:</b>	leucemia mieloide crónica
<b>LCNEC:</b>	carcinoma neuroendocrino de células grandes (del inglés, <i>large cell neuroendocrine carcinoma</i> )
<b>MUT:</b>	mutado
<b>NA:</b>	no analizado
<b>ND:</b>	no determinado
<b>NOS:</b>	no especificado (del inglés, <i>not otherwise specified</i> )
<b>NV:</b>	no valorable
<b>NSCLC:</b>	carcinoma de pulmón no microcítico (del inglés, <i>non-small cell lung carcinoma</i> )
<b>OMS:</b>	Organización mundial de la salud
<b>PCR:</b>	reacción en cadena de la polimerasa (del inglés, <i>polymerase chain reaction</i> )
<b>PNA-LNA PCR:</b>	del inglés, <i>peptide nucleic acid-locked nucleic acid PCR</i>
<b>RFLP:</b>	polimorfismo en la longitud de los fragmentos de restricción (del inglés, <i>restriction fragment lenght polymorphysm</i> )

**SAGE:** análisis seriado de la expresión génica (del inglés *serial analysis of gene expression*)

**SCC:** carcinoma epidermoide (del inglés, *squamous cell carcinoma*)

**SCLC:** carcinoma de pulmón microcítico (del inglés, *small cell lung carcinoma*)

**SISH:** hibridación in situ con plata (del inglés, *silver in situ hybridization*)

**TMA:** matriz tisular (del inglés, *tissue microarray*)

**VPP:** valor predictivo positivo

**VVN:** valor predictivo negativo

**WT:** ausencia mutación (del inglés, *wild-type*)



## **1. INTRODUCCIÓN**



## 1.1. GENERALIDADES DEL CÁNCER DE PULMÓN

### 1.1.1. Epidemiología del cáncer de pulmón

El cáncer de pulmón es el tumor maligno más importante en cuanto a incidencia y mortalidad en el mundo occidental. Se diagnostican alrededor de 1.3 millones de casos nuevos cada año y el pronóstico es pobre: el número de fallecimientos por esta causa se cifra en 1.1 millones al año, y la supervivencia global a los cinco años no supera el 15% (Jemal et al., 2010).

En España, la tendencia es similar a la de los países occidentales. Es uno de los tres tumores malignos más frecuentes dentro de la población masculina; en el año 2006, la incidencia se estimó en 68.30 casos por cada 100000 habitantes, mientras que en la población femenina la incidencia fue de 13.80 casos por cada 100000 habitantes (Cabanés et al., 2009). En términos de mortalidad, el cáncer de pulmón sigue siendo la primera causa de muerte por cáncer en hombres y la tercera en mujeres, en el año 2006 fue responsable de 17000 y 2600 muertes, respectivamente (Cabanés et al., 2009). Aunque tanto la incidencia como la mortalidad son más elevadas en hombres, se han observado signos de estabilización en la población masculina en los últimos diez años. Mientras que en el período comprendido entre los años 1988 y 1992 la incidencia de cáncer de pulmón en hombres con respecto a la de mujeres fue 15 veces superior, diez años después ha disminuido hasta alcanzar una proporción de 10 a 1. Lo mismo ha ocurrido con la mortalidad, la razón entre hombres y mujeres ha pasado de 12 a 7.5 entre los años 1995 y 2002 (Cabanés et al., 2009). Esta disminución en la proporción relativa de la tasa de mortalidad por cáncer de pulmón entre hombres y mujeres refleja el descenso anual del 0.7% que ha experimentado la población masculina en ese periodo. Por su parte, en mujeres, la mortalidad por cáncer de pulmón viene experimentando un incremento significativo desde el año 1996, con un crecimiento anual del 4.1% (Cabanés et al., 2009). Todo parece indicar que en España se está reproduciendo el fenómeno experimentado en otros países occidentales, como EEUU, donde el cáncer de pulmón ha pasado a ocupar el primer puesto en mortalidad entre los tumores malignos en mujeres, por delante incluso del cáncer de mama, que tradicionalmente ha sido el tumor más letal entre la población femenina (Jemal et al., 2010). Estos datos son un reflejo de la creciente incorporación de la mujer al consumo de tabaco.

Los estudios epidemiológicos y experimentales señalan al tabaco como el principal factor etiológico en el cáncer de pulmón (Franco, 2005). Su papel directo en la génesis de estos tumores se evidencia al considerar que el riesgo relativo de padecer un cáncer de pulmón entre los fumadores es de 4-13 veces superior que entre los no fumadores (Boyle et al., 1995). En cuanto al tabaquismo pasivo, según diferentes estudios, el riesgo de desarrollar esta enfermedad se incrementa en un 15-25% en las personas expuestas respecto a los que no tienen contacto habitual con fumadores (Boffeta et al., 1998; Zhong et al., 2000). En España, en el año 2000, el tabaco fue

responsable del 91% de los casos de cáncer de pulmón en hombres y del 65% de los casos en mujeres (Cabanés et al., 2009). Además del tabaco, también existen otros carcinógenos, relacionados fundamentalmente con exposiciones ocupacionales (asbestos, radón, arsénico, entre otros), que pueden considerarse responsables del 18% de los casos de cáncer de pulmón en hombres y de menos del 1% en mujeres. Sin embargo, no todos los casos de cáncer de pulmón pueden asociarse a una causa concreta, ni la presencia de un agente etiológico conlleva siempre la aparición de este tipo de tumor. Así, por ejemplo, sólo el 20% de los fumadores desarrollará un cáncer de pulmón a lo largo de su vida. Existen, por tanto, efectos aditivos y sinérgicos entre distintas causas, así como factores de predisposición genética que, quizás por si solos, no son suficientes para el desarrollo de estos tumores pero que, asociados a otros factores ambientales, conducen a su aparición (Carretero, 2005).

### **1.1.2. Anatomía Patológica del cáncer de pulmón**

Desde la primera clasificación histológica de los tumores pulmonares llevada a cabo por la Organización Mundial de la Salud (OMS) en el año 1981, se han realizado considerables progresos en el conocimiento de la patogénesis, la histología y la biología molecular del cáncer de pulmón, lo que se ha traducido en nuevas y sucesivas clasificaciones. El término cáncer de pulmón, tal y como lo define la OMS en su última clasificación del 2004 (Travis et al., 2004), engloba múltiples neoplasias de tipo epitelial, mesenquimal o linfoproliferativo, entre otros. Del total de variantes descritas, el 95% corresponden a tumores epiteliales malignos o carcinomas, lo que hace que en la práctica clínica el término de carcinoma de pulmón o carcinoma broncogénico se haga sinónimo al de cáncer de pulmón (Apéndice A).

Los carcinomas de pulmón, desde el punto de vista histológico, se clasifican en dos grandes grupos según la morfología que presentan las células tumorales. Esta distinción morfológica está relacionada con una clínica y una biología molecular características y condiciona una actitud terapéutica inicial diferente. Dichos grupos son:

- Carcinomas de pulmón de célula pequeña o microcíticos (SCLC, del inglés *small cell lung carcinoma*). Representan aproximadamente el 20% de los tumores. Su evolución clínica es rápida por lo que el tratamiento más común suele ser quimioterapia o radioterapia.
- NSCLCs. Con aproximadamente un 80% del total de casos, es el grupo histológico más frecuente de tumores de pulmón. Clínicamente evolucionan con más lentitud de manera que el tratamiento más común suele ser la cirugía siempre que el estadiaje lo permita.

El presente trabajo se centra en este último grupo histológico, que se caracteriza a su vez por una amplia heterogeneidad y en donde se pueden distinguir, por su frecuencia, tres tipos principales:

- SCCs: tumor epitelial maligno que muestra queratinización y/o puentes intercelulares y que se origina a partir del epitelio bronquial.
- ACs: tumor epitelial maligno con diferenciación glandular o formación de mucina.
- Carcinomas de células grandes (LCCs, del inglés *large cell carcinoma*): carcinoma indiferenciado que no cumple los criterios de un SCLC, un AC o un SCC; tratándose, por tanto, de un diagnóstico de exclusión.

### **1.1.3. Biología molecular del cáncer de pulmón**

Como se ha indicado anteriormente, la elevada frecuencia y mortalidad del cáncer de pulmón ponen de manifiesto la necesidad de comprender los mecanismos moleculares que contribuyen a su aparición y evolución. Desde el punto de vista molecular, el proceso de carcinogénesis se inicia y progresa debido a la acumulación de alteraciones en genes esenciales en el control de la proliferación y muerte celular. Los principales procesos celulares que contienen genes alterados y que se encuentran desregulados en cáncer son: división celular, muerte celular programada o apoptosis, detección y reparación del daño en el ADN, regulación de la expresión génica, adhesión celular y transducción de señales. La regulación anormal de los mismos confiere a la célula tumoral una serie de rasgos distintivos que pueden resumirse en: insensibilidad a señales antiproliferativas, independencia de señales mitóticas para su división, poder replicativo ilimitado, capacidad para evadir la apoptosis, y capacidad para inducir la angiogénesis y dar lugar a metástasis (Hanahan & Weinberg, 2000). La naturaleza de esas alteraciones es diversa, pudiéndose tratar, entre otras, de mutaciones puntuales, cambios epigenéticos, amplificaciones o deleciones cromosómicas, translocaciones, pérdida de heterocigosidad, alteraciones en la regulación transcripcional y los niveles de expresión génica. En última instancia, estas alteraciones se traducen a nivel funcional en la activación de oncogenes y la inactivación de genes supresores tumorales que son esenciales para el control de la proliferación celular (Sidransky, 2002; Santarius et al., 2010).

Los tumores de pulmón se caracterizan por un complejo patrón de alteraciones moleculares (Figura 1). Como fruto de la investigación en este campo, a lo largo de las últimas décadas se han identificado genes con un papel clave en la carcinogénesis pulmonar (Sekido et al., 1998, Sánchez-Céspedes, 2003) (Tabla 1). Si se consideran estos genes por los procesos celulares en los que participan, las alteraciones claves para el desarrollo del cáncer de pulmón

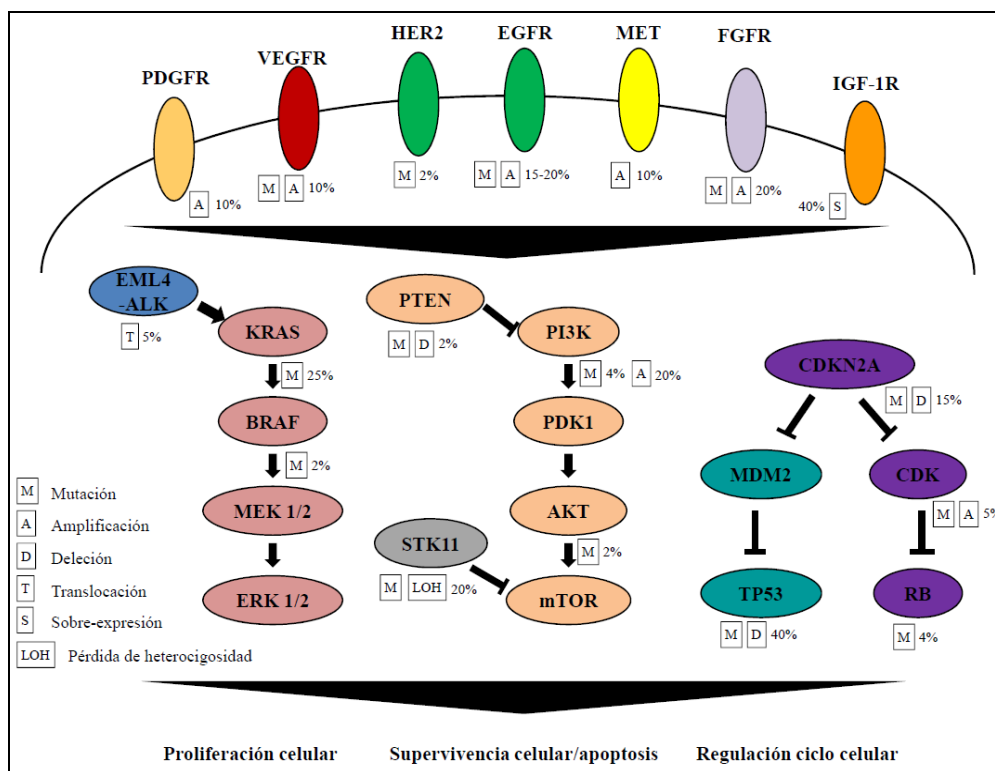
serían la desregulación de los mecanismos de reparación del ADN (*TP53*), del ciclo celular (*RB* y *CDKN2A*) y de la transducción de señales (*KRAS*, *EGFR*, *PIK3CA* y *PTEN*, entre otros).

**Tabla 1. Genes implicados en la carcinogénesis pulmonar**

Gen	Función biológica	Referencias
<i>EGFR</i>	Receptores y proteínas con actividad quinasa o fosfatasa implicadas en la transducción de señales	Lynch et al., 2004; Paez et al., 2004; Pao et al., 2004
<i>ERBB2</i>		Bunn et al., 2001; Sasaki et al., 2006
<i>BRAF</i>		Davies et al., 2002; Brose et al., 2002; Garnett et al., 2004
<i>KRAS</i>		Westra et al., 1993; Cooper et al., 1997
<i>STK11</i>		Sánchez-Céspedes et al., 2002; Carretero et al., 2004
<i>PIK3CA</i>		Massion et al., 2002; Yokoi et al., 2003; Samuels et al., 2004
<i>PTEN</i>	Factores de transcripción	Yokomizo et al., 1998
<i>MYC</i>		Shiraishi et al., 1989; Richardson & Johnson, 1993
<i>TP53</i>	Reguladores del ciclo celular	Takahashi et al., 1989
<i>CDKN2A</i>		Packenham et al., 1995; Kelley et al., 1995
<i>RB</i>		Kelley et al., 1995; Classon & Harlow, 2002

Aunque muchos de los genes alterados en cáncer de pulmón, también se han asociado con otros tipos tumorales, es importante destacar que el espectro mutacional de algunos, como *TP53* y *KRAS*, es específico de los tumores de pulmón y diferente al que presentan en otros tipos de tumores, pudiéndose asociar estos cambios a las alteraciones provocadas en el ADN por los carcinógenos presentes en el tabaco (Hainaut & Pfeifer, 2001; Ahrendt et al., 2001). Además, dentro del cáncer de pulmón, tanto la presencia como la frecuencia de alteraciones de estos genes varían según el tipo histológico. Así, puede decirse que existe una correlación entre la histología y las alteraciones moleculares (Sekido et al., 1998; Sánchez-Céspedes, 2003). A modo de ejemplo se puede mencionar la mayor prevalencia de las alteraciones en los genes *KRAS* y *EGFR* en los ACs en comparación con los SCCs (Langer et al., 2010).

En los últimos años se ha puesto de manifiesto que los genes que se han asociado con el cáncer de pulmón hasta el momento representan probablemente una pequeña parte del conjunto de genes que participan en su desarrollo. El catálogo se está ampliando con la identificación de nuevas alteraciones, como la amplificación de *MET* (Engelman et al., 2007a; Bean et al., 2007), la translocación *ALK* (Soda et al., 2007), la sobreexpresión y amplificación de *IGF1R* (Chitnis et al., 2008; Dziadziuszko et al., 2008), la amplificación de *FGFR1* (Weiss et al., 2010) o las mutaciones en el gen *DDR2* (Hammerman et al., 2011), entre otras. En este sentido es importante destacar que los genes que se encuentran alterados con relativa frecuencia, >15-20%, representan una minoría (*TP53*, *KRAS*, *EGFR*, *STK11*, *CDKN2A*); mientras que para la mayoría de ellos (*PTEN*, *ERBB2*, *BRAF*, *PIK3CA*, *MET*, *ALK*), la frecuencia descrita hasta el momento es baja, 5-10%, (Figura 1).



**Figura 1. Genes alterados en cáncer de pulmón** (figura adaptada a partir de Ding et al., 2008). Las alteraciones genéticas en cáncer de pulmón se dan fundamentalmente en genes que codifican receptores, proteínas con actividad quinasa y fosfatasa, y factores de transcripción que participan en distintas vías de transducción de señales controlando, entre otros, los procesos de proliferación y supervivencia celular. Se indica, para los más relevantes, el tipo y la frecuencia de la alteración.

Esta situación está promoviendo la búsqueda sistemática de nuevas alteraciones que ayuden a completar este catálogo y permitan una mejor comprensión de los mecanismos moleculares subyacentes a la carcinogénesis pulmonar. Recientemente, la secuenciación del genoma humano y el uso de tecnologías de análisis masivo han contribuido a la identificación de nuevos genes relevantes para el desarrollo y la evolución de distintos tipos de tumores. Mediante técnicas de secuenciación masiva se ha identificado el papel de varios oncogenes activados por mutaciones puntuales en cáncer de pulmón, como *ERBB4*, *EPHA3* y *NF1* (Ding et al., 2008). Otra fuente de información lo constituye el estudio sistemático de variaciones en el número de copias de ADN mediante técnicas como la hibridación genómica comparada (CGH, del inglés *comparative genomic hybridization*) y, más recientemente, mediante *microarrays* de CGH (Pinkel et al., 1998; Pollack et al., 1999; Greshock et al., 2004). Estos estudios están revelando la existencia de regiones cromosómicas que presentan ganancias y pérdidas de material genético con relativa frecuencia y que, por tanto, son candidatas a albergar oncogenes y genes supresores tumorales, respectivamente. Entre los oncogenes alterados por amplificación génica que se han identificado recientemente están *NKX2-1* (Weir et al., 2007), *SOX4* (Medina et al., 2009), *SOX2* (Bass et al., 2009), *TFDP1* y *CTNND1* (Castillo et al., 2010), pero para la mayoría de las regiones aún no se han identificado los genes subyacentes que podrían ser importantes mediadores en la

formación y la progresión de estos tumores (Kim et al., 2005; Weir et al., 2007; Lockwood et al., 2008; Santarius et al., 2010).

Además de la identificación de genes que son dianas de alteraciones genéticas, epigenéticas o del número de copias, los cambios en los niveles de expresión génica también tienen relevancia en el desarrollo tumoral ya que muchas de estas alteraciones producen cambios significativos en los patrones de expresión de un número elevado de genes. En las últimas décadas se han realizado numerosos estudios basados en diversas tecnologías de análisis masivo, como *microarrays* y análisis seriado de la expresión génica (SAGE, del inglés *serial analysis of gene expression*), con el objeto de definir el perfil de expresión génica característico de distintos tipos tumorales y, entre ellos, del cáncer de pulmón (Velculescu et al., 1995; Schena et al., 1996; Pollack, et al., 1999). El reconocimiento de firmas genéticas asociadas con vías de señalización claves para la carcinogénesis, además de impulsar la identificación de genes relevantes para el desarrollo tumoral, está conduciendo al descubrimiento de subtipos moleculares, contribuyendo así a una clasificación de los tumores más precisa. Asimismo, estas firmas pueden ayudar a predecir la evolución de los pacientes, al asociarse con un mejor o peor pronóstico, o con respuesta a una determinada terapia.

Entre los principales hallazgos derivados de los estudios realizados en cáncer de pulmón hasta la fecha, se pueden citar: la correlación entre los perfiles de expresión génica y la clasificación histológica, identificándose firmas genéticas características de los distintos tipos histológicos dentro de los carcinomas de pulmón (Bhattacharjee et al., 2001; Garber et al., 2001; Nacht et al., 2001; Borczuk et al., 2003; Parmigiani et al., 2004; Nakamura et al., 2006); y la identificación de marcadores y firmas genéticas con potencial valor pronóstico y de respuesta a terapia, demostrándose la utilidad clínica de los análisis de *microarrays* (Wigle et al., 2002; Beer et al., 2002; Kikuchi et al., 2003; Chen et al. 2007; Shedden et al., 2008; Agulló-Ortuño et al., 2010). El análisis global de la expresión génica también puede ser de utilidad a la hora de asociar los perfiles de expresión con las alteraciones genéticas propias del tumor. No obstante, en cáncer de pulmón la información relativa al estudio de alteraciones genéticas y su correlación con los patrones de expresión génica es escasa (Beer et al., 2002; Takeuchi et al., 2006; Chitale et al., 2009).

En los últimos años, la identificación de las alteraciones genético-moleculares propias de los distintos tipos de tumores está adquiriendo una nueva dimensión. Más allá de permitir una mejor comprensión de los mecanismos moleculares subyacentes, estas alteraciones se están convirtiendo en marcadores de utilidad en el diagnóstico y en el establecimiento del pronóstico. Además, está empezando a guiar el desarrollo de nuevos fármacos y sus indicaciones. Se establece así cierta reciprocidad: por un lado, la identificación del catálogo completo de alteraciones en cáncer está suponiendo una información complementaria y, en ocasiones necesaria, para el diagnóstico y para la búsqueda de marcadores pronósticos y predictivos; y por



otro lado, la necesidad de desarrollar nuevas estrategias de detección y terapéuticas, está conduciendo a la búsqueda cada vez más activa y productiva de alteraciones cromosómicas, genéticas y epigenéticas. El objetivo básico de la investigación molecular en cáncer ha sido y sigue siendo, por tanto, el identificar los genes implicados en el desarrollo tumoral. Pero, considerándolo desde esta perspectiva global, adquiere un nuevo trasfondo, ya que la definición del listado completo de dichas alteraciones supondrá un primer paso de un proceso que culminará con el empleo de estos marcadores moleculares con fines diagnósticos, pronósticos y terapéuticos en la rutina clínica (Weir et al., 2007).

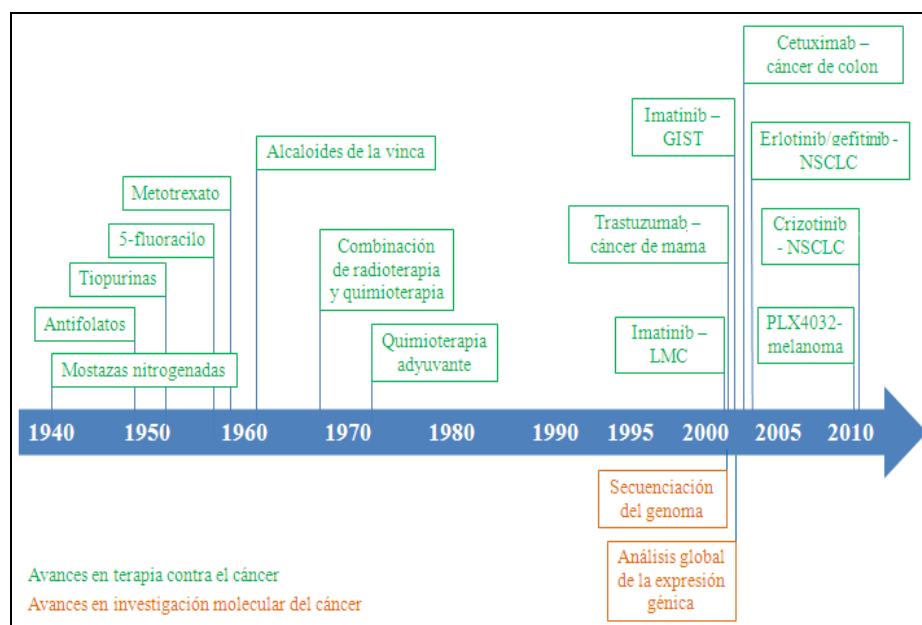
## 1.2. DIANAS TERAPÉUTICAS Y MARCADORES PREDICTIVOS EN CÁNCER

### 1.2.1. Estrategias terapéuticas en cáncer

Centrándonos en el abordaje terapéutico del cáncer, cabe destacar que el acercamiento al tratamiento de la mayoría de las neoplasias sólidas y, entre ellas, los NSCLCs, ha sido tradicionalmente y continúa siendo necesariamente multidisciplinar. Las opciones clásicas son cirugía, radioterapia y quimioterapia, solas o combinadas. La cirugía y la radioterapia dominaron este campo hasta la década de los años 60. Posteriormente, la quimioterapia basada en agentes citotóxicos, tanto adyuvante como neoadyuvante, se sumó al arsenal terapéutico y continúa siendo la principal opción tanto para tumores primarios como metastásicos (DeVita & Chu, 2008; Coate et al., 2009) (Figura 2). En NSCLCs, al igual que ocurre en otros tipos de tumores, el tratamiento depende del estadiaje de la enfermedad. La cirugía representa una opción en los estadios iniciales, cuando la enfermedad está localizada y se cumplen los criterios de resecabilidad. Un tratamiento multimodal basado en radioterapia y/o quimioterapia es el indicado cuando la enfermedad se encuentra localmente avanzada, mientras que en los casos de enfermedad metastásica avanzada el tratamiento suele ser quimio paliativo (Farray et al., 2005; Pisters & Le Chevallier, 2005; Dempke et al., 2010). El cisplatino y su análogo el carboplatino son los agentes citotóxicos empleados con mayor frecuencia para el tratamiento de los NSCLCs. La combinación de cualquiera de éstos con agentes como gemcitabina, vinorelbina, paclitaxel o docetaxel, parece mejorar la eficacia del tratamiento (Arriagada et al., 2004; Winton et al., 2005; Murray et al., 2006; Douillard et al., 2006).

Estas tres modalidades se encuadrarían en un esquema clásico de tratamiento, según el cual, todos los pacientes reciben el mismo tratamiento basado, fundamentalmente, en el diagnóstico anatomopatológico y en el estado del paciente (Dalton et al., 2006). En los últimos años, debido a la necesidad de mejorar las opciones terapéuticas existentes, ha emergido una cuarta estrategia: la terapia dirigida (Figura 2). Como se ha indicado anteriormente, la

investigación molecular en cáncer lleva años demostrando la heterogeneidad de los tumores y la variabilidad en cuanto a su evolución de tumores que presentan características clínicas y anatomopatológicas comunes (Coyle et al., 2010). La consideración del perfil molecular de los tumores está posibilitando una auténtica revolución, ya que muchas de las alteraciones genético-moleculares identificadas se están empleando como dianas de los nuevos tratamientos dirigidos (Dalton et al., 2006; DeVita & Chu, 2008; Raguz et al., 2008; Pao et al., 2009; Janku et al., 2010).



**Figura 2. Evolución de la terapia contra el cáncer** (figura adaptada a partir de DeVita & Chu, 2008). Se muestra en un cronograma una selección de los eventos más significativos relacionados con el desarrollo de la terapia contra el cáncer, indicándose los agentes farmacológicos que han ido apareciendo y los tipos de tumores en los que los algunos de los fármacos dirigidos más destacados son eficaces. Asimismo se señalan algunos de los avances más relevantes en la investigación molecular del cáncer que están revolucionando el abordaje terapéutico de la enfermedad, ya que al identificar alteraciones en genes implicados en distintas formas de carcinogénesis, permiten el desarrollo de fármacos dirigidos contra los productos de estas alteraciones moleculares. LCM: leucemia mieloide crónica, NSCLC: carcinoma de pulmón no microcítico, GIST: tumor del estroma gastrointestinal.

### 1.2.2. Terapias convencionales no dirigidas versus terapias dirigidas: dianas terapéuticas

El concepto de terapia dirigida está íntimamente ligado al de diana terapéutica, que podría definirse como un componente celular que se encuentra alterado de forma específica en la célula tumoral, y que le confiere una ventaja selectiva sobre las células normales, contribuyendo a la transformación celular y a la progresión del tumor. Como se ha indicado anteriormente, gran parte de los esfuerzos actuales dentro de la investigación en cáncer se centran en el desarrollo de drogas dirigidas contra procesos alterados en la célula tumoral, tales como la transducción de señales, el control del ciclo celular, la reparación del ADN o la apoptosis. Estas alteraciones son

desencadenadas por la activación o inactivación de genes que, a su vez, constituyen posibles dianas moleculares para el diseño de estas terapias dirigidas (Pao et al., 2009).

Dado que la quimioterapia convencional basada en agentes citotóxicos también actúa sobre procesos celulares, como los anteriormente indicados, la denominación de terapia dirigida podría resultar equívoca. No obstante, la distinción entre ambas opciones de tratamiento se esclarece al tener en cuenta algunas consideraciones. En el caso de la terapia dirigida, el diseño de la droga está basado en el conocimiento de la biología molecular del tumor y la identificación de sus alteraciones genético-moleculares. Por su parte, el diseño de los agentes quimioterapéuticos citotóxicos convencionales, considerados tradicionalmente como no dirigidos, se basa en el análisis de productos químicos y/o naturales sobre líneas celulares o modelos animales y en la evaluación de su eficacia para controlar el desarrollo tumoral, sin que exista conocimiento previo del componente o proceso celular sobre los que actúan. Por otro lado, los agentes dirigidos actúan sobre las dianas y la expresión o alteración de estas últimas son un requisito para que exista respuesta al tratamiento. Las dianas de las terapias dirigidas son generalmente componentes proximales de las vías de transducción de señales, tales como receptores de membrana o proteínas que actúan como mediadores en la transducción de señales hacia el núcleo. En cambio, los agentes quimioterapéuticos convencionales afectan a eventos distales de la transducción de señales, actuando directamente sobre los propios ácidos nucleicos o sobre proteínas que participan en la síntesis de ADN o en el ensamblaje de los microtúbulos (Hait, 2009). La quimioterapia basada en agentes citotóxicos supone, por tanto, un coste significativo de toxicidad para el paciente, ya que actúa indistintamente sobre las células tumorales y normales. La terapia dirigida, por su parte, al neutralizar algún componente que está alterado en el tumor pero no en las células normales, consigue interrumpir la progresión del tumor sin efectos adversos para las células normales del paciente (Sledge, 2005; Coate et al., 2009). La especificidad de las terapias dirigidas deriva, por tanto, de su capacidad para explotar la adicción oncogénica que se crea en el tumor como consecuencia de la alteración genética, y otras vulnerabilidades características de los tumores (Weinstein et al., 2008; Workman & de Bono, 2008; Weil et al., 2008).

Actualmente, la mayoría de las dianas terapéuticas contempladas en la clínica son receptores con actividad tirosina quinasa, como EGFR, HER2, KIT, PDGFR, VEGFR, IGF-1R, entre otros, que se encuentran alterados en distintos tipos de tumores y son componentes claves en los procesos de transducción de señales. Asimismo, otras proteínas que participan a nivel intracelular en la transducción de señales, fundamentalmente a través de las vías PI3K/AKT/mTOR y RAS/MEK/ERK, también están siendo considerados como potenciales dianas terapéuticas (Workman & de Bono, 2008; Janku et al., 2010).

### 1.2.3. Biomarcadores en cáncer: la evolución de los marcadores predictivos

La incorporación de fármacos basados en dianas moleculares representa un cambio paradigmático en el tratamiento del cáncer. En la actualidad, el poder terapéutico del conocimiento de las dianas moleculares resulta patente en varios tumores (Tabla 2). No obstante, este éxito aún no se ha extendido de forma generalizada. La falta de fármacos dirigidos deriva de las limitaciones en cuanto al conocimiento de la biología molecular de los tumores y del conjunto de dianas terapéuticas. En relación con este hecho, es importante señalar que los tumores en los que la inhibición de una única diana tiene un efecto terapéutico representan una minoría. Aunque los tumores anteriormente indicados demuestren el principio del poder terapéutico de un agente dirigido contra una alteración genético-molecular propia del tumor, en ningún caso reflejan la complejidad molecular de los mismos. Como ya se ha indicado, los tumores se caracterizan por presentar múltiples alteraciones, pudiendo considerarse cada una de ellas posibles dianas terapéuticas. El efecto terapéutico “ideal” se conseguiría por tanto mediante la administración simultánea de varios fármacos que bloqueen distintos componentes de la vía, o mediante un fármaco que actúe sobre varias moléculas a la vez (Dalton et al., 2006; Coyle et al., 2010; Knight et al., 2010).

**Tabla 2. Terapia dirigida contra dianas moleculares alteradas en cáncer**

Tumor	Diana	Fármaco	Referencias
Cáncer de mama, cáncer gástrico	HER2	Trastuzumab	Slamon et al., 1989; Slamon et al., 2001; Bang et al., 2010
Leucemia mieloide crónica	BCR-ABL	Imatinib	Druker et al., 1996
Tumor del estroma gastrointestinal	KIT	Imatinib	Rubin et al., 2001
Carcinoma de pulmón no microcítico	EGFR	Gefitinib/Erlotinib	Lynch et al., 2004; Paez et al., 2004; Pao et al., 2004

Por otro lado, al trasladar a la clínica los nuevos fármacos dirigidos, se está poniendo de manifiesto que estos fármacos sólo funcionan en una pequeña proporción de pacientes, en cuyos tumores, la diana del fármaco tiene especial relevancia. Como ejemplo podría considerarse la asociación entre la respuesta a trastuzumab y la amplificación del gen *HER2* en cáncer de mama, por citar alguno de los tumores anteriormente indicados (Tabla 2). En este caso, como en otros, se cumple que la respuesta se asocia con alguna alteración de la diana del fármaco. Sin embargo, la existencia de una droga que bloquea de forma selectiva una diana no garantiza su eficacia clínica, por lo que el impacto derivado de la identificación de dianas frente a la que dirigir fármacos es bajo si no se identifican los pacientes que van a beneficiarse de dicha terapia (Sawyers, 2008a). Con todo ello, se introduce el concepto de marcador predictivo, el cual podría definirse como aquella característica del paciente o del tumor que se asocia con una mejor o peor evolución en respuesta a un tratamiento concreto (Dalton et al., 2006; Sawyers, 2008a; Coate et al., 2009; Pérez-Soler, 2009).

Actualmente, los dos aspectos relevantes en el campo de la terapia dirigida serían, por tanto, conocer la biología subyacente a la droga y a su diana, y disponer de marcadores predictivos que permitan seleccionar a los pacientes que van a experimentar una respuesta terapéutica eficaz (Ladanyi, 2008). En ocasiones, la diana y el marcador predictivo de respuesta son el mismo, como por ejemplo, en cáncer de mama, donde la amplificación del gen *HER2* predice la respuesta a un anticuerpo monoclonal dirigido contra el producto de dicho gen, el receptor HER2. En cualquier caso, resulta evidente que el conocimiento de la diana, caracterizando la vía a la que pertenece y el papel que desempeña en el contexto molecular del tumor, es esencial para definir los posibles marcadores de respuesta (Hait, 2009). Así, aludiendo a la reciprocidad que se establece entre la investigación básica en cáncer y su aplicación en la clínica, los marcadores predictivos podrán identificarse a partir de la caracterización molecular de los distintos tipos de tumores (Herbst & Lippman, 2007; Pao et al., 2011b). Además de estudiar la diana terapéutica o la droga y su mecanismo de acción, existen diferentes métodos para identificar los marcadores predictivos. Por un lado, el análisis masivo de tumores con evolución clínica conocida permite, al comparar entre respondedores y no respondedores, la identificación de firmas genéticas con expresión diferencial entre ambos grupos. Por otro lado, mediante modelos experimentales, como líneas celulares que son sensibles o no a la acción de un determinado fármaco, se pueden caracterizar elementos reguladores que median la respuesta a dicha droga. Así, en cáncer de pulmón y en otros tipos de tumores, un gran número de vías de transducción de señales están siendo revisadas desde la perspectiva de que algunos de sus componentes puedan ser marcadores de sensibilidad o de resistencia a agentes terapéuticos dirigidos ya aprobados o en fase de desarrollo (Herbst & Lippman, 2007; McDermott et al., 2007; Sos et al., 2009; Janku et al., 2010).

Sin embargo, al igual que ocurre con las dianas terapéuticas, un único marcador puede ser de escaso valor si se tiene en cuenta que la progresión de los tumores y su respuesta al tratamiento están determinadas por varios factores y componentes celulares. En un futuro próximo, se deberán analizar una serie de marcadores, creándose algoritmos terapéuticos para identificar el mejor tratamiento para cada paciente (Workman & de Bono, 2008; Coyle et al., 2010; Wistuba et al., 2011). Los marcadores predictivos representan, por tanto, una problemática crucial en el campo de la terapia contra el cáncer. Una gran limitación deriva del hecho de que los ensayos clínicos que conducen a la aprobación de los fármacos, se vienen realizando, en general, sin la selección de pacientes en función de estos marcadores predictivos. Además, en la práctica clínica diaria, estos marcadores no se aplican de forma rutinaria para seleccionar la administración de los fármacos correspondientes. Hoy por hoy no existe, salvo contadas excepciones, un consenso universal en cómo, cuándo y a quiénes aplicar los distintos agentes farmacológicos disponibles, preguntas claves si se quiere que la terapia personalizada en cáncer sea una realidad (Dalton et al., 2006; Wistuba et al., 2011; Tursz et al., 2011; Mendelsohn et al., 2011).

Para la mayoría de los tumores el tratamiento se basa en una combinación de agentes, así por ejemplo, en el caso del cáncer de colon existen varios fármacos aprobados como irinotecan, oxaliplatino, fluoropirimidinas, cetuximab, panitumumab y bevacizumab. Dichos agentes se administran en regímenes de una, dos o tres drogas, pero no existe un criterio sólido para empezar el tratamiento con uno de ellos salvo el de evitar cetuximab o panitumumab en pacientes con tumores portadores de mutaciones en el gen *KRAS* (Allegra et al., 2009; Jimeno et al., 2009; Amado et al., 2008). En ocasiones, aunque existe un fármaco dirigido contra una diana bien caracterizada que produce una respuesta terapéutica, el biomarcador o el conjunto de biomarcadores óptimos para predecir la respuesta o la resistencia no han sido establecidos (Dempke et al., 2010). Tal es el caso de los inhibidores antiangiogénicos, como bevacizumab, que tienen como diana la vía VEGF (Duda et al., 2010), o de los inhibidores de IGF-1R (Gualberto et al., 2009). En otras ocasiones, el marcador de respuesta no se ha seleccionado correctamente, siendo la administración de los anticuerpos monoclonales contra EGFR, cetuximab y panitumumab, en cáncer de colon metastásico el ejemplo reciente más representativo. En los primeros ensayos con cetuximab se asumió que sólo los pacientes cuyos tumores expresaran la diana del fármaco se beneficiarían de esta terapia, por lo que la valoración de los niveles de expresión de EGFR por IHQ se consideró como el criterio de selección para la administración del tratamiento. En los años siguientes se comprobó que había pacientes con ausencia de expresión de EGFR, que respondían a cetuximab de igual manera que pacientes cuyos tumores tenían una marcada expresión del receptor y que, en virtud de la indicación del fármaco, no deberían beneficiarse del tratamiento. En análisis retrospectivos se identificó que la presencia de mutaciones en el gen *KRAS*, un marcador que en ningún momento se había contemplado en el estudio de la respuesta a cetuximab, representaba un marcador de respuesta negativo (Lièvre et al., 2006). Estos hallazgos hicieron que, años después de que se presentaran los primeros resultados clínicos, se cambiara la indicación de cetuximab para el tratamiento de cáncer de colon en pacientes con tumores *KRAS wild-type*. Posteriormente, esta indicación se confirmó en el desarrollo del anticuerpo monoclonal panitumumab (Amado et al., 2008). Recientemente, se ha comprobado que no todos los pacientes con tumores con ausencia de mutaciones en el gen *KRAS* se benefician del tratamiento basado en anticuerpos anti-EGFR. Estudios retrospectivos están apuntando a otros biomarcadores que, sumados, permitirían establecer un algoritmo para seleccionar a los pacientes que se van a beneficiar de estos fármacos, como la presencia de mutaciones en los genes *BRAF* (Di Nicolantonio et al., 2008) o *PIK3CA* (Sartore-Bianchi et al., 2009), o la expresión de ligandos del receptor EGFR, como anfiregulina y epiregulina (Khambata-Ford et al., 2007). Con este ejemplo se pone de manifiesto la necesidad de tener cohortes de pacientes con una información clínica detallada en la que poder evaluar una serie de marcadores como parte del desarrollo del ensayo clínico del fármaco. Además, ilustra la necesidad de no introducir sesgos en la selección de los marcadores predictivos, siendo

imprescindible contemplar el catálogo completo de las alteraciones del tumor y caracterizar de forma precisa la vía molecular a la que pertenece la diana terapéutica (Xie et al., 2008; Wistuba et al., 2011).

La correcta identificación del marcador predictivo no es el final del camino ya que aún quedaría por definir la metodología adecuada para su caracterización (Dempke et al., 2010). Hay que considerar que la alteración del posible marcador de respuesta puede medirse a nivel de ADN, ARN o proteína; y que se dispone de diversas técnicas para su estudio (PCR, hibridación o IHQ). No existen, de forma generalizada, consensos ni un control de calidad que permitan estandarizar la metodología de análisis, ni asegurar la fiabilidad y reproducibilidad de los resultados. A modo de ejemplo se puede recordar la situación experimentada en cáncer de mama, donde han tenido que pasar 20 años desde que se identificara la amplificación de *HER2* como marcador de respuesta a trastuzumab hasta que se consensuara la hibridación *in situ* fluorescente (FISH, del inglés *fluorescent in situ hybridization*) como la metodología de elección para su análisis (Sauter et al., 2009). Este hecho pone de manifiesto la importancia de validar desde el punto de vista metodológico -a nivel preanalítico, analítico y postanalítico- el análisis del marcador de respuesta, ya que si no se dispone de un método validado, aunque se tenga un agente dirigido eficaz y un marcador de respuesta adecuado, no se podrá identificar al paciente que pueda beneficiarse del tratamiento (Ladanyi, 2008; Xie et al., 2008). Como ejemplo del cambio que tiene que producirse en este sentido, se puede considerar uno de los ensayos que motivaron la aprobación de panitumumab para pacientes con tumores de colon *KRAS wild-type* por parte de la *European Medicines Agency*, donde se utilizó un kit comercial para la determinación de mutaciones en dicho gen (Amado et al., 2008). De hecho, el éxito del uso de un kit comercial en el contexto de un ensayo clínico ha sido reconocido internacionalmente por una importante revista (Roses, 2008). Así, el ensayo clínico no sólo debería definir la indicación de un fármaco según el contexto molecular del tumor, sino también proponer una metodología para llevar a cabo la determinación del marcador de respuesta correspondiente.

A pesar de las limitaciones existentes, la identificación de marcadores predictivos empieza a guiar las decisiones terapéuticas y representa un importante paso para individualizar la terapia y mejorar el manejo clínico de los pacientes. De hecho, su uso deberá ser un requisito para las aprobaciones de los fármacos basado en dianas moleculares y para el establecimiento de las indicaciones óptimas de los mismos (Dalton et al., 2006). La combinación de una terapia dirigida y de un marcador asociado de respuesta será la clave del éxito de la medicina personalizada, donde la droga adecuada se administrará al paciente adecuado (Sawyers, 2008a y 2008b; Yeatman et al., 2009; Hait, 2009; Pérez-Soler, 2009). El estudio de marcadores predictivos puede considerarse, por tanto, como un paradigma de la investigación traslacional en cáncer. La situación actual debería ser aquélla en la que los tumores se analicen de forma prospectiva en el momento del diagnóstico y a lo largo de su evolución para un panel de alteraciones genético-

moleculares que sean relevantes para la sensibilidad o resistencia a los fármacos, de igual manera que se utilizan paneles de anticuerpos para establecer el diagnóstico anatomopatológico (Ladanyi, 2008). Así, el clínico podrá definir las opciones de tratamiento no sólo en base a características clínicas o estadísticas, sino también a características específicas del paciente y de su tumor, de manera que, incluso, en estadios iniciales, los pacientes se asignen al régimen terapéutico más adecuado a las características moleculares de su tumor (Dalton et al., 2006; Herbst & Lippman, 2007).

El concepto de que la respuesta a una droga está biológicamente condicionada no se restringe sólo a los nuevos agentes terapéuticos dirigidos, por lo que la utilidad de los marcadores predictivos también puede aplicarse a la quimioterapia convencional. Así, en NSCLCs, al igual que en otros tipos de tumores, algunos marcadores también se están empleando para predecir la respuesta a agentes citotóxicos convencionales, pudiéndose citar la expresión de ERCC1 como marcador de respuesta a platinos (Olaussen et al., 2006), o de RRM1 en relación con la respuesta a gemcitabina (Rosell et al., 2004). No obstante, el presente trabajo se centra en el estudio de marcadores predictivos de agentes terapéuticos dirigidos.

### 1.3. DIANAS TERAPÉUTICAS Y MARCADORES PREDICTIVOS EN CÁNCER DE PULMÓN

#### 1.3.1. El valor predictivo de la histología en cáncer pulmón

Desde hace algunos años existe un interés súbito y creciente por la histología del cáncer de pulmón (Hirsch et al., 2008; Stinchcombe et al., 2010), que puede justificarse por varias razones. Los ITKs dirigidos contra EGFR son un claro ejemplo de cómo los fármacos dirigidos muestran, en general, una mayor actividad en tumores con un tipo histológico concreto al que se asocian las alteraciones genéticas que son dianas de dichos fármacos. La histología contribuye, por tanto, a decidir la estrategia terapéutica: en el ejemplo concreto de los ITKs, un diagnóstico de AC implicaría el análisis de mutaciones en el gen *EGFR* para valorar la posible sensibilidad del tumor a este tipo de inhibidores, dado que las mutaciones en el gen se dan preferentemente en este tipo histológico en comparación con los SCCs (Lynch et al., 2004; Pao et al., 2004; Paez et al., 2004). De igual modo, muchos agentes quimioterápicos no dirigidos actúan sobre ciertos procesos celulares cuya función puede variar según el tipo histológico del tumor. Así por ejemplo, los niveles de timidilato sintasa (enzima implicada en la síntesis de ADN) o de ERCC1 (enzima que participa en los mecanismos de reparación del ADN), se relacionan con resistencia a premetrexed y platinos, respectivamente, siendo su expresión más elevada en SCCs (Scagliotti et al., 2008; Marinis et al., 2008; Olaussen et al., 2006). La situación es aún más compleja si se tiene en cuenta



que la administración de algunos agentes terapéuticos debe evitarse en ciertos tipos histológicos, no sólo porque no ofrecen una mejor tasa de respuesta, siendo el caso, como se ha indicado anteriormente, del uso de premetrexed en SCCs; sino también porque su uso, por ejemplo bevacizumab en SCCs se asocia con complicaciones (Sandler et al., 2006). En cambio, hay otros agentes terapéuticos, como los fármacos dirigidos contra IGF-1R, cuya respuesta óptima se observa precisamente en SCCs (Karp et al., 2009).

Por tanto, la situación terapéutica actual del cáncer de pulmón y, en general, del cáncer, pone de manifiesto que el establecimiento del tratamiento, ya esté basado en quimioterapia convencional o en fármacos dirigidos, requiere un diagnóstico histológico preciso y reproducible. Sin embargo, la distinción entre los distintos tipos tumorales, a partir únicamente de la morfología, puede ser difícil, especialmente en los casos de los tumores pobremente diferenciados o cuando sólo se dispone para el diagnóstico anatomopatológico de citologías o biopsias pequeñas –broncoscopias o biopsias con aguja gruesa– (Loo et al., 2010; Nicholson et al., 2010; Terry et al., 2010; Conde et al., 2010). Esta limitación de material intensifica la necesidad de un diagnóstico preciso, ya que la prioridad a la hora de analizar las posibles alteraciones moleculares asociadas con la respuesta a un tratamiento concreto se verá condicionada por la histología.

La identificación y el empleo de marcadores que permitan discriminar los distintos tipos histológicos en cáncer de pulmón tienen, por tanto, cada vez más relevancia. La llegada, hace aproximadamente una década, de los estudios de análisis global de la expresión génica mediante *microarrays*, significaron una mejora en la clasificación de muchas neoplasias malignas (Perou et al., 2000). La tecnología de *microarrays* para el estudio de los perfiles de expresión génica ha permitido recapitular las características moleculares de los distintos tipos de tumores al nivel de genes individuales, y representa una herramienta valiosa en la medida que permite caracterizar y clasificar de forma más precisa los diferentes tumores. La mayoría de los estudios previos realizados en cáncer de pulmón han demostrado la correlación existente entre los perfiles de expresión génica y la clasificación histológica (Bhattacharjee et al., 2001; Garber et al., 2001; Nacht et al., 2001; Borczuk et al., 2003; Parmigiani et al., 2004; Nakamura et al., 2006). No obstante, el impacto práctico en la clasificación de los carcinomas de pulmón ha sido comparativamente menor con respecto a otros tipos de tumores (Hayes et al., 2006), por lo que la búsqueda de nuevos marcadores aún continúa.

Dentro de la clasificación de los principales tipos histológicos de NSCLCs, el diagnóstico de LCC siempre se ha considerado un diagnóstico de exclusión, dado que los carcinomas de pulmón en los que no se observan signos concluyentes de diferenciación glandular o epidermoide son clasificados como tal (Travis et al., 2004). Además representa una categoría cada vez más cuestionada en base a los resultados de los estudios de expresión génica que evidencian que el diagnóstico de LCC no es reproducible y que estos carcinomas pueden presentar firmas genéticas similares a las de ACs o SCCs, y no un perfil genético o marcadores proteicos propios que los

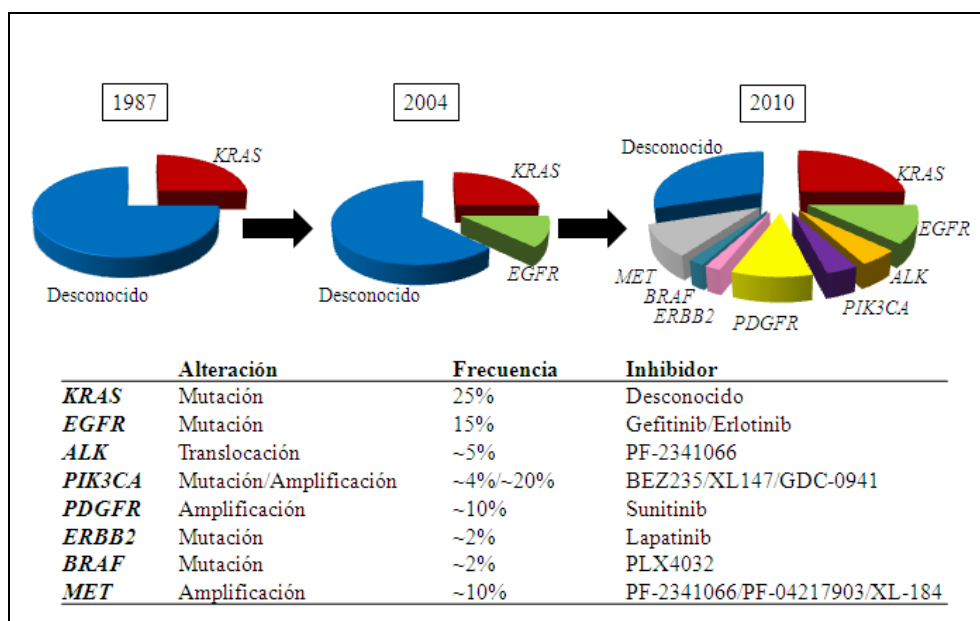
segregue del resto de carcinomas de pulmón (Yamagata et al, 2003; Au et al., 2004a). De hecho, en los análisis no supervisados, los LCCs no constituyen una entidad definida sino que, en su mayoría, aparecen agrupados junto con ACs o SCCs (Garber et al., 2001; Boreczuk et al., 2003; Angulo, datos sin publicar). La ausencia de signos histológicos de diferenciación glandular o epidermoide en el examen microscópico, unida a los resultados de los análisis de la expresión génica, parecen confirmar que la mayoría de los LCCs son en realidad ACs o SCCs pobremente diferenciados y no un grupo genéticamente definido y distinto (Hou et al., 2010). Tal y como se ha indicado anteriormente, desde el punto de vista terapéutico, este diagnóstico no debería ser utilizado si se tiene en cuenta que estos pacientes podrían ser tratados con fármacos no adecuados si se confirmara que su tumor es un SCC, o bien podrían ser descartados para el análisis de marcadores relevantes en ACs. Teniendo en cuenta estas premisas, resulta relevante estudiar si el análisis de marcadores diferencialmente expresados entre ACs y SCCs puede reducir el número de LCCs y contribuir así a un diagnóstico histológico más preciso y reproducible.

### **1.3.2. Dianas terapéuticas y marcadores predictivos en carcinomas de pulmón no microcíticos**

En las últimas décadas se ha experimentado un cambio paradigmático en el conocimiento y el manejo del cáncer de pulmón. A medida que los avances en el estudio de la biología molecular de estos tumores han conducido a la identificación de diferentes alteraciones genéticas asociadas con su desarrollo, ha sido posible dividir los NSCLCs en subgrupos genéticamente definidos de acuerdo con la frecuencia de dichas alteraciones. El desarrollo de las terapias dirigidas ha demostrado además que esta división en entidades moleculares es una estrategia terapéutica prometedora, ya que existen inhibidores específicos dirigidos contra los productos de estas alteraciones genéticas que están probando su eficacia en ensayos clínicos (Figura 3) (Sharma et al., 2010; Pao & Girard, 2011; Janku et al., 2011a).

Las mutaciones en el gen *EGFR* ilustran la relevancia terapéutica de los subgrupos moleculares dentro de los NSCLCs y representan un ejemplo para el estudio de otras alteraciones en el contexto de las terapias dirigidas. Desde su identificación, EGFR ha emergido como una de las dianas terapéuticas más relevantes en el tratamiento del cáncer de pulmón. Las primeras evidencias clínicas de respuesta a ITKs dirigidos contra EGFR en pacientes con NSCLCs surgieron entre los años 2001 y 2004, y condujeron al uso clínico de dos fármacos: gefitinib y erlotinib. En el año 2004 se estableció por primera vez la relación entre la presencia de mutaciones en el dominio tirosina quinasa del gen *EGFR* y la respuesta a estos fármacos (Lynch et al, 2004; Paez et al., 2004; Pao et al., 2004). Distintos estudios retrospectivos y prospectivos han demostrado que los pacientes con mutaciones en el gen *EGFR* tratados con ITKs presentan una tasa de respuesta superior y una supervivencia mayor en comparación con un tratamiento

basado en quimioterapia, incluso en tratamiento en primera línea (Mitsudomi et al., 2005; Sequist et al., 2008; Mok et al., 2009; Rosell et al., 2009, Rosell et al., 2011).



**Figura 3. Entidades moleculares dentro de los carcinomas de pulmón no microcíticos** (figura adaptada a partir de Pao & Girard, 2011 y Sharma et al., 2010). A lo largo de las últimas décadas, la identificación del catálogo de alteraciones genéticas característico de los carcinomas de pulmón ha permitido definir subgrupos, lo que representa una prometedora estrategia terapéutica ya que existen inhibidores específicos dirigidos contra los productos de las alteraciones genéticas características de cada uno de los subgrupos moleculares.

La presencia de mutaciones en el gen *EGFR*, identificadas en aproximadamente el 10-15% de los NSCLCs, define un subgrupo distintivo dentro de los ACs de pulmón (Lynch et al., 2004; Paez et al., 2004; Pao et al., 2004; Conde et al., 2006; Takeuchi et al., 2006). Como ya se ha indicado previamente, se han descrito alteraciones en otros genes (*KRAS*, *BRAF*, *ERBB2*, *PIK3CA*, *MET*, *PDGFR*, entre otros). Aunque la frecuencia de dichas alteraciones parece ser, en general, relativamente baja, definen entidades moleculares genéticamente diferentes dentro de los NSCLCs (Figura 3) (Pao & Girard, 2011). Si en el contexto de las terapias dirigidas en cáncer se asume que la respuesta está genéticamente condicionada, es posible que cada una estas alteraciones genéticas representen, al igual que *EGFR*, dianas terapéuticas y/o marcadores predictivos para el desarrollo de fármacos eficaces para el tratamiento de cada subgrupo de tumores. Así, la respuesta de pacientes con tumores portadores de la translocación *ALK* al fármaco crizotinib confirma este planteamiento (Kwak et al., 2010), por lo que es esperable que fármacos dirigidos contra cada una de las alteraciones que se han descrito en cáncer de pulmón sean eficaces en tumores portadores de dichas alteraciones (Sharma et al., 2010; Pao & Girard, 2011; Janku et al., 2011a). En cáncer de pulmón, y en general en cualquier tipo de tumor, establecer la frecuencia de las principales alteraciones genéticas que permitirían priorizar el uso de terapias dirigidas es, por tanto, cada vez más relevante.

#### 1.4. APROXIMACIONES METODOLÓGICAS AL ESTUDIO DE MARCADORES PREDICTIVOS EN CÁNCER: ANÁLISIS DE MUTACIONES EN *EGFR* EN CÁNCER DE PULMÓN

Como se ha indicado anteriormente en la presente introducción, a la hora de trasladar el estudio de marcadores predictivos a la clínica, resulta imprescindible disponer de un método sensible y específico para caracterizar las alteraciones moleculares subyacentes. En este sentido es significativo revisar la situación que se está viviendo en el análisis de mutaciones en el gen *EGFR* ya que, pasados más de siete años desde que se describieran por primera vez y a pesar del impacto clínico para los pacientes con cáncer de pulmón, aún no se dispone de un método estandarizado para seleccionar a los pacientes candidatos a recibir una terapia basada en ITKs dirigidos contra *EGFR* (Pao & Ladanyi, 2007; Eberhard et al., 2008).

La secuenciación directa por el método de Sanger fue la metodología empleada en los estudios que evidenciaron la relación entre la presencia de mutaciones en *EGFR* y la respuesta a ITKs, y a pesar de su relativa baja sensibilidad, continúa siendo el método más ampliamente utilizado para la caracterización de mutaciones en *EGFR* y en otros genes. En líneas generales, la secuenciación requiere al menos un 50% de ADN mutado para detectar la presencia de alteraciones genéticas, un porcentaje realmente limitante en el contexto del cáncer de pulmón si se tiene en cuenta que la mayoría de las muestras que se reciben para el diagnóstico y para la realización de estudios moleculares son biopsias pequeñas y el porcentaje de celularidad tumoral es bajo (Eberhard et al., 2008; Loo et al., 2010; Nicholson et al., 2010; Terry et al., 2010; Conde et al., 2010). La pirosecuenciación o técnicas de secuenciación masiva representan alternativas más sensibles a la secuenciación por el método de Sanger, pero aún están lejos de su aplicación en la práctica clínica habitual por su elevado coste (ten Bosch & Grody, 2008). A lo largo de la última década se han desarrollado distintas estrategias para favorecer la amplificación del alelo mutado frente al alelo *wild-type* y mejorar así la sensibilidad de la secuenciación directa. Todas ellas se basan en modificaciones de la PCR, ya sea a nivel de la secuencia de los *primers* o de las condiciones de temperatura, por lo que también pueden utilizarse como un paso previo a la realización de técnicas de secuenciación más sensibles como la pirosecuenciación. Algunas de las más representativas son las siguientes: (1) diseño de *primers* específicos del alelo mutado y empleo de un péptido que bloquea la amplificación del alelo *wild-type* [PNA-LNA PCR clamp, del inglés *peptide nucleic acid-locked nucleic acid PCR*, (Miyamae et al., 2010)]; (2) digestión con enzimas de restricción que reconocen secuencias dianas presentes en el alelo *wild-type* de manera que, tras una primera PCR y su posterior digestión, sólo los alelos mutados actúan como moldes para la amplificación en una segunda PCR (Asano et al., 2006); (3) disminución de la temperatura de desnaturalización de la PCR para favorecer la separación de los heterodúplex

formados por la presencia de la mutación, enriqueciendo así la proporción de alelos mutados que actúan como moldes en cada ciclo de amplificación [COLD-PCR, del inglés *co-amplification at lower denaturation temperature-PCR*, (Li et al., 2008a)]. Por otro lado, las técnicas de PCR-RFLP (del inglés *restriction fragment length polymorphism*) representan una alternativa a la secuenciación. Permiten detectar los dos tipos de mutaciones más frecuentes en *EGFR*, las deleciones en el exón 19 y la mutación puntual L858R en el exón 21, mediante la distinta longitud de los productos de PCR resueltos por electroforesis capilar (Pan et al., 2005). Además, avances recientes en técnicas moleculares han permitido el desarrollo de métodos más sensibles para la detección de mutaciones mediante PCR cuantitativa en tiempo real a través del empleo de sondas específicas (Endo et al., 2005; Zhou et al., 2006) o de la tecnología ARMS [del inglés *amplified refractory mutation system*, (Kimura et al., 2006a)]. Además del conjunto de técnicas basadas en ADN y en amplificación por PCR, en los últimos años se han desarrollado anticuerpos específicos que reconocen formas mutadas del receptor *EGFR*, concretamente la deleción de quince nucleótidos E746-A750 en el exón 19 y la mutación L858R en el exón 21, permitiendo su detección por IHQ (Yu et al., 2009; Kato et al., 2010; Brevet et al., 2010; Kawahara et al., 2010).

En la siguiente tabla (Tabla 3) se resumen las metodologías que se han detallado anteriormente, quedando patente la diversidad que existe actualmente y la aparente falta de estandarización (Pao & Ladanyi, 2007). Para las mutaciones en *EGFR*, y en general para cualquiera de las alteraciones genéticas relevantes desde el punto de vista terapéutico, es necesario evaluar las propiedades analíticas (especificidad y sensibilidad) de las distintas técnicas, así como las posibilidades de aplicarlas en la rutina de un laboratorio de diagnóstico, con el fin de determinar cuál es el mejor método para caracterizar la alteración genética, evaluar su valor predictivo de respuesta al tratamiento, y emplearlo para seleccionar a los pacientes candidatos a recibir una terapia dirigida.

**Tabla 3. Métodos empleados para el análisis de mutaciones en el gen *EGFR***  
(Tabla modificada de Pao & Ladanyi, 2007)

Técnicas	Sensibilidad (%DNA mutado)	Mutaciones identificadas
<b>Secuenciación directa</b>		
Método de Sanger	25	Conocidas y nuevas
Pirosecuenciación	5-10	Conocidas y nuevas
<b>Técnicas de enriquecimiento del alelo mutado</b>		
PNA-LNA PCR clamp (del inglés, <i>peptide nucleic acid-locked nucleic acid PCR</i> )	1	Conocidas
Digestión con enzimas de restricción	5-10	Conocidas
COLD-PCR (del inglés, <i>co-amplification at lower denaturation temperature-PCR</i> )	1-10	Conocidas y nuevas
<b>PCR-RFLP (análisis de polimorfismos de fragmentos de restricción)</b>	5	Conocidas
<b>PCR cuantitativa en tiempo real</b>		
Scorpions-ARMS (del inglés, <i>amplified refractory mutation system</i> )	1	Conocidas
TaqMan PCR	10	Conocidas
<b>Inmunohistoquímica</b>	*	Conocidas

\* Sensibilidad biológica pendiente de establecer

Considerando globalmente los diferentes puntos tratados en la presente introducción, resulta evidente que, en la actualidad, en cáncer de pulmón, y en general en los distintos tipos de tumores, es imprescindible caracterizar todas las posibles alteraciones genético-moleculares relevantes. Al establecer su frecuencia real en series clínicas, se pueden identificar los diferentes subgrupos de tumores definidos a nivel molecular por cada una de estas alteraciones. Además, en el contexto de las terapias dirigidas y de la personalización del tratamiento en cáncer, es necesario establecer su valor clínico ya que estas alteraciones pueden representar dianas terapéuticas o marcadores predictivos de respuesta o de resistencia a un determinado tratamiento. Asimismo, resulta imprescindible disponer de métodos de análisis que permitan el correcto estudio de dichas alteraciones genético-moleculares para que la medicina personalizada sea una realidad y se puedan caracterizar de forma precisa y reproducible las alteraciones que van a permitir definir la mejor estrategia terapéutica para el paciente en función del perfil molecular de su tumor.

## **2. OBJETIVOS**





El presente trabajo de tesis se plantea con el objetivo general de profundizar en el conocimiento de las principales alteraciones genético-moleculares en NSCLCs en el contexto de las terapias dirigidas y la medicina oncológica personalizada.

Los objetivos concretos son los siguientes:

1. Analizar los perfiles de expresión génica en una serie de NSCLCs mediante *microarrays* de ADNc, con el fin de:
  - 1.1. Identificar firmas genéticas y marcadores asociados con la histología de los NSCLCs que puedan contribuir a mejorar la clasificación anatomopatológica de los principales tipos de carcinomas de pulmón.
  - 1.2. Identificar firmas genéticas y marcadores que puedan correlacionarse con alteraciones en genes relevantes para la carcinogénesis pulmonar como *EGFR*, *KRAS*, *TP53* y *PIK3CA*.
2. Trasladar a la práctica clínica los hallazgos más relevantes del estudio de perfiles de expresión génica y del análisis de alteraciones en genes implicados en el desarrollo del cáncer de pulmón que sean susceptibles de tratamiento, con dos fines
  - 2.1. Diagnóstico:

Analizar el valor de la expresión proteica de P63 determinada mediante IHQ en el diagnóstico diferencial de los principales tipos de NSCLCs.
  - 2.2. Predictivo:

Estudiar alteraciones genéticas, consideradas dianas terapéuticas o marcadores predictivos de respuesta, en los genes *EGFR*, *KRAS*, *BRAF*, *PIK3CA*, *MET* e *IGF-1R* en una cohorte de pacientes diagnosticados de NSCLCs, con el fin de:

    - 2.2.1. Evaluar la frecuencia y el tipo de alteraciones.
    - 2.2.2. Estudiar el contexto genético-molecular en el que aparecen estas alteraciones.
    - 2.2.3. Evaluar la relación entre las alteraciones genéticas-moleculares identificadas con características clínico-patológicas de los tumores.
3. Comparar distintas metodologías para la caracterización de mutaciones en el gen *EGFR* en NSCLCs: secuenciación directa del producto de PCR, PCR cuantitativa en tiempo real e IHQ, con el fin de:
  - 3.1. Evaluar sus propiedades analíticas.
  - 3.2. Establecer la sensibilidad de cada uno de los métodos en el contexto real de la práctica clínica de un laboratorio de diagnóstico.



### **3. MATERIALES Y MÉTODOS**



### 3.1. ANÁLISIS DE PERFILES DE EXPRESIÓN GÉNICA EN CARCINOMAS DE PULMÓN NO MICROCÍTICOS

#### 3.1.1. Selección de casos

Para la primera parte del trabajo, el análisis de los perfiles de expresión génica, se seleccionaron 69 tumores primarios congelados de pacientes diagnosticados de NSCLCs, así como tejido pulmonar normal congelado de seis de estos pacientes. La selección se realizó en base a la disponibilidad de ARN de calidad. Con el objetivo de validar las observaciones derivadas de este estudio se creó una serie independiente con 75 NSCLCs adicionales, fijados en formol al 10% e incluidos en parafina (FFPE, del inglés *formalin-fixed paraffin embedded*). Las muestras fueron proporcionadas, después de conseguir el consentimiento informado de cada paciente, por el Banco de Tumores del Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas (CNIO) en colaboración con distintos hospitales españoles (Hospital Universitario 12 de Octubre, Hospital Universitario Puerta de Hierro, Hospital Virgen de la Arrixaca y Hospital Virgen de la Salud).

Todas las preparaciones histológicas disponibles de los tumores incluidos en ambas series fueron revisadas, de forma independiente, por dos patólogos (Esther Conde, EC, y Fernando López-Ríos, FL-R), quienes reevaluaron el diagnóstico anatomopatológico según la última clasificación de tumores de pulmón de la OMS (Travis et al., 2004). Las características histológicas de los tumores incluidos en el estudio de los perfiles de expresión génica fueron las siguientes: 30 (44%) ACs, 36 (52%) SCCs y tres (4%) LCCs. Para los tumores de la serie de validación, dichas características fueron: 39 (52%) ACs, 29 (39%) SCCs y siete (9%) LCCs. Las características clínico-patológicas recogidas fueron el hábito tabáquico, el sexo, el tamaño tumoral, el grado de diferenciación y la afectación ganglionar.

#### 3.1.2. Extracción de ácidos nucleicos

Antes de proceder a la extracción de ácidos nucleicos, y con el fin de estimar el porcentaje de celularidad tumoral, se realizaron y tiñeron con hematoxilina y eosina (H&E) secciones representativas de cada uno de los tumores incluidos en las dos series: la de análisis de la expresión génica y la de validación. Para tratar de minimizar la posible influencia en los niveles de expresión génica de las células normales acompañantes, los tumores congelados se diseccionaron meticulosamente para asegurar que cada caso contuviera al menos un 70% de células tumorales. Posteriormente, se cortaron, en función del material disponible, 15-20 secciones de 10-20  $\mu\text{m}$  de cada muestra.

El ADN de las muestras congeladas y para finadas se obtuvo tras digestión con proteinasa K, seguida de extracción con fenol-cloroformo, según protocolos previamente descritos (Fernández et al., 2004; Conde et al., 2006). En el caso de los tumores para finados, antes de proceder a la digestión, fue necesario despara finar los cortes mediante dos lavados con xilol y un lavado con etanol absoluto. Por otra parte, para la extracción de ARN a partir de las muestras congeladas se utilizó *TRIZOL* (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). El ARN extraído se purificó a continuación con el kit *RNeasy mini* (Qiagen Inc., Valencia, CA, USA), siguiendo las indicaciones del fabricante y protocolos previamente descritos (Tracey et al., 2002; Fernández et al., 2004).

Una pequeña alícuota del ADN y del ARN extraídos de cada muestra se reservó para su cuantificación en un espectrofotómetro NanoDrop. Los ratios  $A_{260}/A_{280}$  y  $A_{260}/A_{230}$  se registraron para verificar la pureza y la calidad de los ácidos nucleicos, respectivamente, considerándose los ratios  $A_{260}/A_{280} \sim 1,8$  y  $A_{260}/A_{230} \sim 2$  como valores de referencia para aceptar la muestra para su posterior análisis. Además, en el caso del ARN, su calidad se comprobó mediante visualización de las bandas de ARN ribosomal en un gel de agarosa en condiciones desnaturalizantes. El ADN y el ARN extraídos se conservaron a  $-80^{\circ}\text{C}$ .

### 3.1.3. Estudio de la expresión génica mediante *microarrays*

Para el estudio de los perfiles de expresión génica de los 69 NSCLCs y de los seis tejidos de parénquima pulmonar normal se realizó un análisis de *microarrays* de ADNc, tecnología de análisis masivo que permite evaluar de forma simultánea la expresión de miles de genes, comparando la abundancia relativa de cada gen en dos ARN de distinta procedencia: muestras problema y control. Las muestras problema correspondieron a los 69 NSCLCs y los seis tejidos de pulmón normal, y como muestra control se utilizó *Universal Human Reference RNA* (Stratagene, La Jolla, CA, USA).

Como paso previo a la retro-transcripción de cada ARN a ADNc, se procedió a su amplificación según protocolos previamente descritos (Tracey et al., 2002). 2.5  $\mu\text{g}$  de ARN amplificado, tanto de las muestras problema como de la muestra control, se utilizaron como molde para la síntesis de ADNc fluorescente y su posterior hibridación, siguiendo protocolos previamente descritos (Tracey et al., 2002; Fernández et al., 2004). El ADNc de cada una de las muestras de los pacientes se marcó con el fluorocromo Cy5, mientras que el ADNc control se marcó con Cy3 (GE Healthcare, Piscataway, NJ, USA). Como plataforma de *microarrays* de ADNc se utilizó el CNIO OncoChip<sup>TM</sup> v.2, un *microarray* especialmente diseñado para el estudio de alteraciones en la expresión génica relacionadas con cáncer, que incluye un núcleo central de unos 2500 genes con función molecular conocida e implicados en procesos celulares desregulados

en cáncer, junto con genes implicados en la respuesta a drogas, genes específicos de tejido y genes controles hasta sumar un total de unos 9000 genes aproximadamente.

Tanto el análisis de las señales fluorescentes como su cuantificación se realizaron con el programa GenePix 5.0 (Axon Instruments Inc., Union City, CA, USA). La relación entre las señales fluorescentes Cy5 y Cy3 para cada una de las muestras fueron normalizadas con la herramienta DNMAID (Vaquerizas et al., 2004). El programa GEPAS se utilizó para procesar los datos normalizados y transformados a escala semilogarítmica (Tracey et al., 2002; Herrero et al., 2003). Antes de proceder con el análisis bioinformático, se calculó la media de expresión de aquellos genes que aparecían replicados en el array, y cualquier gen sin datos de expresión en más del 10% de las muestras analizadas fue excluido del análisis posterior. Tras este cribado, un total de 7935 genes pudieron ser sometidos al análisis bioinformático. Los programas SOTARRAY y *GeneCluster/TreeView* fueron utilizados para la clasificación de las muestras y para la visualización de los perfiles de expresión, respectivamente. A la hora de analizar los datos de expresión se siguieron dos aproximaciones. Por un lado, con el objetivo de determinar si había alguna evidencia que explicara la agrupación de las muestras en función de los perfiles de expresión génica, se sometieron a un análisis no supervisado, utilizando como método de agrupación jerarquizada el método *complete-linkage*. Tras excluir los genes que mostraban una variación menor de tres veces en sus niveles de expresión a lo largo de las muestras, se realizó una agrupación jerarquizada de los 69 tumores y de los seis tejidos normales en base a los perfiles de expresión de los 1075 transcritos más variables. Por otro lado, mediante un análisis supervisado, se trataron de identificar los genes relevantes para diferenciar subgrupos de tumores definidos por sus características histológicas o sus alteraciones genéticas. Estas posibles asociaciones fueron evaluadas mediante un análisis *t-test*, empleando 200000 permutaciones para computar el nivel de significación, y tomando como referencia a la hora de establecer dicho nivel la tasa de falsos positivos (FDR, del inglés *false discovery rate*) (Qian & Huang, 2005). Los genes diferencialmente expresados fueron clasificados funcionalmente en base a una búsqueda exhaustiva en las bases de datos PubMed y GeneOntology.

#### 3.1.4. Análisis de mutaciones

Con el objetivo de conocer el estado mutacional de genes implicados en la carcinogénesis pulmonar, se realizó un análisis de mutaciones mediante secuenciación directa del producto de PCR en todos los NSCLCs incluidos en las series de *microarrays* y de validación. Los genes evaluados fueron los siguientes: *LKBI*, también conocido como *STK11*, (exones 1-9), *KRAS* (exón 2), *TP53* (exones 5-8), *EGFR* (exones 18-21), *BRAF* (exones 11 y 15) y *PIK3CA* (exones 9 y 20). Para la amplificación y secuenciación de los genes *LKBI*, *KRAS*, *TP53* y *EGFR*, se utilizaron *primers* (cebadores) previamente descritos (Fernández et al., 2004; Conde et al., 2006). En el caso

de los genes *PIK3CA* y *BRAF*, la secuencia de nucleótidos de los *primers* utilizados se detalla en la siguiente tabla (Tabla 4). En base a lo descrito en la literatura, el análisis de mutaciones en los genes *EGFR*, *KRAS*, *BRAF* y *LKBI* se realizó únicamente en los ACs, mientras que el análisis de los genes *TP53* y *PIK3CA* se realizó en la serie completa.

**Tabla 4. *Primers* utilizados en el estudio mutacional de los genes *PIK3CA* y *BRAF***

Gen	Primer	Secuencia del cebador (5'-3')
<i>PIK3CA</i> -9	F	GTTACTATTCTGTGACTGGTG
	R	GCTGAGATCAGCCAAATTCAG
<i>PIK3CA</i> -20	F	CTGACCA AACTGTTCTTATTAC
	R	AAACATAGAACATTTGCAAGAC
<i>BRAF</i> -11	F	CTCTCAGGCATAAGGTAATG
	R	ACAGTGAATATTTCTTTGATG
<i>BRAF</i> -15	F	CATAATGCTTGCTCTGATAGG
	R	GGCCAAAATTTAATCAGTGG

F: *primer* directo, del inglés *forward*. R: *primer* reverso, del inglés *reverse*.

Todas las reacciones de PCR se hicieron por duplicado y las reacciones de secuenciación se realizaron tanto en dirección directa como reversa según protocolos previamente descritos (Fernández et al., 2004; Conde et al., 2006). Los electroferogramas se analizaron de forma visual y cualquier alteración genética identificada se confirmó por secuenciación de un producto de PCR independiente.

### 3.1.5. PCR cuantitativa en tiempo real

Tras comparar los perfiles de expresión génica de tumores portadores o no de alteraciones en los genes *EGFR*, *TP53* y *PIK3CA*, se seleccionaron algunos genes que, por sus diferencias de expresión en ambos grupos, podrían ser relevantes para diferenciar subgrupos de tumores definidos por la presencia o ausencia de dichas alteraciones genéticas. Los genes seleccionados fueron *PRODH*, *CDH3* y *PIK3CA*, respectivamente, y para confirmar las diferencias observadas en su expresión se utilizó la técnica de PCR cuantitativa en tiempo real. En un primer paso, el ARN total, tratado con la nucleasa *RNase-free DNase I* (Qiagen), de cada una de las muestras incluidas en la serie de *microarrays* fue retrotranscrito con el enzima *Superscript II RNase H-Reverse Transcriptase* (Invitrogen), siguiendo las especificaciones del fabricante. Los niveles de ARN mensajero se midieron por PCR cuantitativa en tiempo real mediante el método de la curva estándar y se utilizó *Sybrgreen* (Applied Biosystems Inc., Foster City, CA, USA) como fluoróforo para la detección de los productos de PCR. La amplificación se realizó por triplicado utilizando el ABI Prism 7900 Sequence Detector (Applied Biosystems Inc.). Como control interno para la



normalización de los niveles de expresión, se utilizó el mensajero del gen *TBP*, que codifica la proteína de unión a la región promotora TATA.

Las secuencias de los *primers* empleados en el análisis por PCR cuantitativa en tiempo real se detallan en la siguiente tabla (Tabla 5).

**Tabla 5. *Primers* utilizados en la confirmación, por PCR cuantitativa en tiempo real, de diferencias en la expresión génica identificadas en el análisis de *microarrays***

Gen	Primer	Secuencia del cebador (5'-3')
<i>PRODH</i>	F	TAGTCCCCAACGCACAGACA
	R	GGACATCCATCCGCTGTAGC
<i>CDH3</i>	F	TATGAGCTCTTTGGCCACGC
	R	TTGGGCTTGTGGTCATTCTG
<i>PIK3CA</i>	F	AAGGCCACTGTGGTTGAATTG
	R	TCTTGCCGTAAATCATCCCC
<i>TBP</i>	F	CACGCCAGCTTCGGAGAGT
	R	GGCACGAAGTGCAATGGTC

F: *primer* directo, del inglés *forward*. R: *primer* reverso, del inglés *reverse*.

### 3.1.6. Construcción de matrices tisulares

Con el objetivo de validar algunas de las observaciones derivadas del análisis de los perfiles de la expresión génica, se construyeron tres matrices tisulares (TMA, del inglés *tissue microarray*) con los 75 NSCLCs parafinados, siguiendo para ello el protocolo previamente descrito (Conde et al., 2006). Dos patólogos (EC y FL-R) revisaron secciones representativas de estos tumores y seleccionaron tres áreas en cada muestra, evitando aquellas con necrosis, inflamación o queratinización. Como controles, se incluyeron tejido normal de pulmón y otros carcinomas (mama y riñón).

### 3.1.7. Análisis inmunohistoquímico

Para validar las alteraciones relevantes en los niveles de expresión génica observadas en el estudio de *microarrays*, se valoró por IHQ la expresión de diversas proteínas en los TMAs contruidos. Los anticuerpos utilizados, sus clones, diluciones y casas comerciales se detallan en la Tabla 6.

El estudio inmunohistoquímico se realizó siguiendo protocolos previamente descritos (Conde et al., 2006). Para la inmunodetección de los anticuerpos P63, DSC3, EGFR y HER2 se utilizó el método de visualización DAKO EnVision (DAKO), mientras que el método empleado para la visualización de P53 fue LSAB (*labelled-streptavidin-biotin*) (DAKO). Con ambos

métodos se empleó peroxidasa como enzima, y 3'-3'-diaminobencidina (DAB) como cromógeno-sustrato. Todas las secciones se contratiñeron con hematoxilina.

**Tabla 6. Anticuerpos utilizados en la validación inmunohistoquímica del estudio de la expresión génica**

Anticuerpo	Clon	Dilución	Casa comercial
DSC3	DSC3-U114	1:25	Research Diagnostics (Flanders, NJ, USA)
EGFR	EGFR.113	1:10	Novocastra Laboratories Ltd. (Newcastle-Upon-Tyne, UK)
HER2	Herceptest	Prediluido	DAKO (Glostrup, Denmark)
P53	DO7	1:50	Novocastra Laboratories Ltd. (Newcastle-Upon-Tyne, UK)
P63	4A4	1:50	DAKO (Glostrup, Denmark)

La valoración de todas las preparaciones fue realizada por dos patólogos (FL-R y Ana Suárez, AS) de forma independiente y sin conocimiento previo de las características clínicas e histológicas de los tumores. Para la evaluación de EGFR y HER2 se siguieron criterios previamente descritos (Conde et al., 2006), mientras que para el resto de marcadores seleccionados, los criterios fueron los siguientes:

- P63: se establecieron tres categorías según la intensidad de la tinción nuclear, negativa (0), de leve a moderada (1) e intensa (2) (Pelosi et al., 2002).
- DSC3: la tinción IHQ se consideró como negativa (0) o positiva (1) cuando  $<10\%$  o  $\geq 10\%$  de las células tumorales, respectivamente, fueron inmunorreactivas.
- P53: la tinción IHQ se consideró como negativa (0) o positiva (1) cuando  $<10\%$  o  $\geq 10\%$  de las células tumorales, respectivamente, mostraban expresión nuclear (Quinlan et al., 1992).

### 3.1.8. Hibridación in situ fluorescente

En el presente estudio se realizó un análisis de FISH para detectar la amplificación del gen *PIK3CA*. Para ello, se utilizaron dos sondas (RP11-466H15 y RP11-245C23) que mapean el gen *PIK3CA* y la región genómica adyacente (3q26), y una sonda control (RP11-165J16) localizada en las proximidades del centrómero del cromosoma 3. Las sondas se elaboraron a partir de BACs (del inglés, *bacterial artificial chromosomes*) obtenidos del *BACPAC Resource Center* del *Children's Hospital Oakland Research Institute* (Oakland, CA, USA). Para el marcaje de las dos sondas dirigidas contra la región de estudio, se utilizó el fluorocromo *Spectrum Orange*, mientras que la

sonda control fue marcada con *Spectrum Green* (Vysis Inc., Downer's Grove, IL, USA), utilizando para ello el kit *CGH nick-translation* (Vysis Inc.) y siguiendo las indicaciones del fabricante. La localización de cada una de las sondas empleadas se validó por separado sobre metafases de células normales, comprobándose que hibridaban en la región cromosómica indicada.

La hibridación se realizó sobre secciones de 4µm, siguiendo el protocolo previamente descrito (Conde et al., 2006). Brevemente, las secciones fueron incubadas durante toda la noche a 56°C para, a continuación, desparafinarlas con dos lavados de xilol. Después de rehidratarlas, a través de una batería de soluciones de etanol con concentración decreciente, se hirvieron en una olla a presión en una solución de EDTA 0.1mM durante 10 minutos. A continuación, se incubaron con pepsina a 37°C durante 30 minutos. Los cortes fueron posteriormente deshidratados. Las preparaciones y las sondas, pre-incubadas a 37°C durante 15 minutos en el tampón de hibridación, fueron desnaturalizadas a 75°C durante 2 minutos, para después proceder a su hibridación en una cámara húmeda a 37°C durante toda la noche. Al día siguiente, las preparaciones se lavaron con tampón SSC 0.4x y NP-40 0.3%. Para su visualización en un microscopio de fluorescencia, las preparaciones fueron teñidas con DAPI (4',6'-diamino-2-fenilindol diclorhidrato).

El análisis de FISH se llevó a cabo sin conocimiento previo de las características genéticas o la naturaleza clínica de las muestras. Las señales fluorescentes se evaluaron en cada caso mediante la cuantificación del número de señales rojas, debidas a copias únicas del gen *PIK3CA* y su región genómica adyacente, y del número de señales verdes, debidas a la sonda control. El conteo se realizó en una media de 180 (100-260) núcleos bien definidos. El incremento en el número de copias y la amplificación génica se definieron por la presencia de 5-7 copias o de más de 7 copias del gen *PIK3CA*, respectivamente.

### 3.1.9. Análisis estadístico

Para comparar la posible relación entre los niveles de expresión génica y las características histológicas o moleculares de los tumores analizados, se utilizó el test exacto de *Fisher*, en el caso de que las variables fueran cualitativas, o el análisis *t*-test, si se trataba de comparar variables cualitativas y cuantitativas. El nivel de significación estadística se estableció en  $p < 0.05$ .

## 3.2. ESTUDIO DE DIANAS TERAPÉUTICAS Y MARCADORES PREDICTIVOS EN CARCINOMAS DE PULMÓN NO MICROCÍTICOS

### 3.2.1. Selección de casos

Esta segunda parte del trabajo, el estudio de dianas terapéuticas y marcadores predictivos en cáncer de pulmón, se realizó en una serie independiente a las dos anteriores. En dicha cohorte

se incluyeron 230 pacientes diagnosticados de NSCLCs en estadios I-II, sometidos a resección completa en el Hospital Universitario 12 de Octubre entre los años 1993 y 2003. El Departamento de Anatomía Patológica de dicho hospital proporcionó muestras parafinadas de cada caso tras obtener el consentimiento informado de cada uno de los pacientes. El seguimiento clínico de estos pacientes se prolongó desde el momento del diagnóstico hasta marzo del año 2011.

De la misma manera que en las series incluidas en el estudio de los perfiles de expresión génica, todas las preparaciones histológicas disponibles de los tumores fueron revisadas de forma independiente por dos patólogos (EC y FL-R), quienes reevaluaron el diagnóstico anatomopatológico según la última clasificación de tumores de pulmón de la OMS (Travis et al., 2004). Las características histológicas de los tumores incluidos en esta serie fueron las siguientes: 65 (28.3%) ACs, 144 (62.6%) SCCs, 20 (8.7%) LCCs y un (0.4%) carcinoma neuroendocrino de células grandes (LCNEC, del inglés *large cell neuroendocrine carcinoma*). Las características clínico-patológicas recogidas fueron las siguientes: sexo, edad, hábito tabáquico, fecha del diagnóstico, fecha y tipo de cirugía, grado de diferenciación, tamaño tumoral, estadio, pTNM, recidiva, método de diagnóstico de la recidiva y localización, supervivencia libre de progresión (calculada a partir del momento del diagnóstico hasta la recidiva), fecha del último seguimiento y estado del paciente en ese momento, y supervivencia global (calculada a partir del momento del diagnóstico hasta la muerte del paciente o la última fecha de contacto).

### 3.2.2. Reclasificación histológica

Con el objetivo de tratar de reducir el número de LCCs de la serie empleada en el estudio de dianas terapéuticas y marcadores predictivos en NSCLCs, se procedió a analizar la expresión proteica por IHQ de dos marcadores en cada tumor: P63 y TTF1. El análisis se realizó sobre secciones completas de 4µm siguiendo protocolos previamente descritos (Conde et al., 2006). Los anticuerpos utilizados, sus clones, diluciones y casas comerciales se detallan en siguiente tabla (Tabla 7).

**Tabla 7. Anticuerpos utilizados en la reclasificación histológica de los LCCs incluidos en el estudio de dianas terapéuticas y marcadores predictivos en NSCLCs**

Anticuerpo	Clon	Dilución	Casa comercial
P63*	4A4	1:50	DAKO (Glostrup, Denmark)
TTF1	8G7G3/1	1:200	DAKO (Glostrup, Denmark)

\*El anticuerpo monoclonal anti-P63 clon A4A permite valorar la expresión total de P63 al reconocer las seis isoformas de la proteína (TAp63α, TAp63β, TAp63γ, ΔNp63α, ΔNp63β, ΔNp63γ).

Tras la incubación con el anticuerpo correspondiente, se empleó el método de visualización DAKO EnVision (DAKO) para la inmunodetección, utilizándose peroxidasa como enzima y DAB como cromógeno-sustrato. Finalmente, todas las secciones se contratiñeron con hematoxilina. La valoración de todas las preparaciones fue realizada, de forma independiente, por dos patólogos (EC y FL-R), utilizando para ello puntos de cortes ya establecidos. En ambos casos, sólo se valoró la tinción nuclear intensa.

- P63: la tinción IHQ se consideró negativa y positiva cuando estaba presente en  $<50\%$  o  $\geq 50\%$  de las células tumorales, respectivamente (Wu et al., 2003).
- TTF1: la tinción IHQ se consideró positiva si estaba presente en  $\geq 5\%$  de las células tumorales, y negativa en caso contrario (Tan et al., 2003).

Además, para todos los LCCs con morfología neuroendocrina, se confirmó dicha diferenciación con los anticuerpos CD56 (clon 123C, dilución 1:50; DAKO) y sinaptofisina (clon SY38, dilución 1:25; DAKO).

### **3.2.3. Extracción de ácidos nucleicos**

Antes de proceder a la extracción de ADN, se realizaron y tiñeron con H&E secciones representativas de los tumores para su revisión por dos patólogos (EC y FL-R), quienes evaluaron el porcentaje de celularidad tumoral.

La extracción de ADN se realizó según protocolos previamente descritos (Angulo et al., 2010). Resumiendo, de cada uno de los tumores incluidos en la serie, se realizaron, por duplicado, entre 15-20 cortes a  $15\mu\text{m}$ . Los cortes fueron desparafinados con dos lavados de xilol y uno de etanol absoluto antes de proceder a su digestión con proteinasa K. La extracción de ADN se realizó, siguiendo las indicaciones del fabricante, con el kit QIAamp DNA FFPE *Tissue* (Qiagen) de forma automatizada en el robot QIAcube (Qiagen). El volumen de elución se fijó en  $50\mu\text{l}$  con el objetivo de asegurar una adecuada concentración de ADN para los estudios moleculares. De forma similar al protocolo seguido con las muestras incluidas en el análisis de la expresión génica, tras la extracción de ADN se procedió a su cuantificación mediante medida de absorbancia en un espectrofotómetro NanoDrop. El ADN extraído se conservó a  $-80^{\circ}\text{C}$ .

### **3.2.4. Análisis de dianas terapéuticas y marcadores predictivos**

La selección de los marcadores a incluir en el presente estudio se realizó en base a una revisión exhaustiva de la literatura. Se analizaron aquellas alteraciones genéticas que han sido

identificadas en cáncer de pulmón, estudiando cada una de ellas en el tipo o tipos histológicos donde han sido descritas con más frecuencia. Además todas las alteraciones se seleccionaron por su relevancia desde el punto de vista terapéutico en base a la eventual disponibilidad de fármacos dirigidos, aprobados o en fase de desarrollo.

Los marcadores analizados, los criterios para su selección, así como la metodología empleada para la caracterización de sus alteraciones y el tipo histológico de los tumores sobre los que se ha realizado cada estudio se resumen en la siguiente tabla (Tabla 8).

**Tabla 8. Estudio de dianas terapéuticas y marcadores predictivos en NSCLCs**

Genes considerados dianas moleculares o marcadores predictivos de respuesta o resistencia a fármacos dirigidos con indicaciones en NSCLCs

Marcador	Tipo de alteración	Metodología	Tipo histológico
EGFR	Mutación	PCR y secuenciación	AC
KRAS	Mutación	PCR y secuenciación	AC

Genes candidatos a ser considerados dianas moleculares o marcadores predictivos en NSCLCs en base a la descripción de alteraciones genético-moleculares y/o a la existencia de fármacos dirigidos en ensayos clínicos

Marcador	Tipo de alteración	Metodología	Tipo histológico
BRAF	Mutación	PCR y secuenciación	AC
PIK3CA	Mutación Amplificación	PCR y secuenciación FISH	AC, SCC, LCC SCC
MET	Amplificación	SISH / FISH	AC, SCC
IGF-1R	Expresión proteica	IHQ	SCC

PCR: reacción en cadena de la polimerasa, FISH: hibridación *in situ* fluorescente, SISH: hibridación *in situ* con plata, IHQ: inmunohistoquímica.

La metodología seguida para el estudio de cada uno de los marcadores se describe en detalle a continuación, agrupándolos por el tipo de alteración que presentan.

### 3.2.4.1. Estudio de alteraciones de secuencia

El estudio de mutaciones en los genes *EGFR* (exones 18-21), *KRAS* (exón 2), *BRAF* (exones 11 y 15), y *PIK3CA* (exones 9 y 20) se realizó por PCR seguida de secuenciación automática siguiendo protocolos previamente descritos (Fernández et al., 2004; Conde et al., 2006), y según la metodología empleada en el estudio de los perfiles de expresión génica, que se ha detallado con anterioridad en el presente trabajo.

### 3.2.4.2. Estudio de alteraciones en el número de copias

El estudio de la amplificación del gen *PIK3CA* en esta serie de tumores se realizó por FISH utilizándose la sonda comercial *Repeat-Free<sup>TM</sup> Poseidon<sup>TM</sup> hTERT* (3q26)/3q11 Control Probe (Kreatech, Amsterdam, the Netherlands). Esta sonda está diseñada como un ensayo dual para detectar amplificación en la región cromosómica 3q26 e incluye una sonda control dirigida contra el centrómero del cromosoma 3. Como controles de la especificidad de la sonda se emplearon tumores con y sin amplificación de *PIK3CA* pertenecientes a la serie previa sobre la que se ha realizado el estudio de la expresión génica mediante *microarrays*.

Para la realización de la técnica se utilizó el kit *DAKO Histology FISH Accessory* (DAKO), introduciendo pequeñas modificaciones a las indicaciones del fabricante (Tubbs et al., 2007). Secciones completas de 4µm de cada tumor se mantuvieron en estufa a 56°C durante toda la noche para, a continuación, desparafinarlas con dos lavados de xilol, y rehidratarlas a través de una batería de soluciones de etanol de concentración decreciente. A continuación, las preparaciones fueron sometidas a un pre-tratamiento, con la solución correspondiente del kit, en baño a 97°C durante 10 minutos. La digestión enzimática se realizó con la solución *Ready-to-Use Pepsin* durante 6 minutos a 37°C. Finalmente, las preparaciones se deshidrataron con soluciones de etanol de concentración creciente. Las condiciones de hibridación fueron las siguientes: desnaturalización de la sonda y tejido a 80°C durante 15 minutos, e hibridación durante 24 horas a 37°C en un hibridador. Al día siguiente, las preparaciones se lavaron con tampón de lavado *Strigent Wash Buffer* en baño a 65°C durante 10 minutos. Por último, las preparaciones fueron teñidas con DAPI para su visualización en un microscopio de fluorescencia.

El análisis del número de copias de *PIK3CA* mediante FISH se llevó a cabo sin conocimiento previo de las características genéticas o la naturaleza clínica de las muestras. En primer lugar, las preparaciones se visualizaron en el objetivo de 100x para identificar las áreas adecuadas para la valoración. Las señales fluorescentes se evaluaron en cada caso mediante la cuantificación del número de señales rojas, debidas a copias únicas de la región cromosómica cubierta por la sonda hTERT, y de señales verdes, debidas a la sonda control, en un total de 20 núcleos bien definidos repartidos en dos áreas diferentes, calculándose el número medio de copias de *PIK3CA* y de copias centroméricas en cada tumor. El punto de corte para definir la amplificación génica de *PIK3CA* se estableció en ratio  $PIK3CA/CEP3 \geq 2$ , siendo dicho ratio la relación entre el número de señales del gen y el número de señales centroméricas. Asimismo, considerando el total de tumores evaluados, se calculó la media del número de copias de *PIK3CA* y de copias centroméricas.

El estudio de la amplificación del gen *MET* se llevó a cabo con la nueva técnica de hibridación *in situ* dual con plata (SISH, del inglés *silver in situ hybridization*), dentro de un programa “*early access to technology*”, de Ventana Medical Systems Inc. (Tucson, AZ, USA), en

el que participó el Laboratorio de Dianas Terapéuticas. Para ello se utilizaron la sonda comercial INFORM MET DNA PROBE (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany), que mapea el gen *MET* y la región genómica adyacente (7q21-q31), y la sonda control INFORM Chromosome 7 (Roche Diagnostics), dirigida contra la región centromérica de dicho cromosoma.

La hibridación se realizó sobre secciones completas de 4µm siguiendo los protocolos establecidos por la casa comercial. El procedimiento experimental completo, que incluye desparafinado, pretratamiento, hibridación, lavado, detección y contra-tinción, se realizó de forma automatizada en la plataforma Ventana *Benchmark XT* (Ventana Medical Systems Inc.). Brevemente, el pre-tratamiento de las preparaciones se realizó con el enzima *ISH Protease 3* durante tres minutos. La sonda MET fue desnaturalizada durante 15 minutos a 95°C e hibridada a 56°C durante 6 horas. Por su parte, y en un segundo paso, la sonda centromérica fue desnaturalizada a 95°C durante 12 minutos e hibridada a 44°C durante 3 horas. Para la sonda MET se realizaron, de forma consecutiva, tres lavados de astringencia a 72°C durante 8 minutos cada uno y, posteriormente, las preparaciones fueron incubadas con el anticuerpo anti-DNP (dinitrofenol) durante 20 minutos. A continuación, las preparaciones fueron incubadas con un anticuerpo conjugado con enzima peroxidasa durante 16 minutos, para después revelar la señal de plata de la sonda MET mediante reacciones secuenciales con el reactivo *Silver C* durante 4 minutos. Por su parte, para la sonda control, se realizaron tres lavados de astringencia consecutivos a 59°C durante 8 minutos, cada uno, para, a continuación, proceder a la incubación con el anticuerpo anti-DNP durante 20 minutos, y posteriormente, con un anticuerpo conjugado con el enzima fosfatasa alcalina durante 12 minutos. La señal centromérica del cromosoma 7 se reveló mediante incubación con el reactivo *Red ISH Naphtol* durante 4 minutos. Finalmente, las preparaciones fueron contrateñidas con *Hematoxilin II*, durante 8 minutos, y con *Bluing reagent* durante 4 minutos. Como medio de montaje se utilizó *Cytoseal*.

El análisis del número de copias de *MET* mediante SISH se llevó a cabo sin conocimiento previo de las características genéticas o la naturaleza clínica de las muestras. Antes de evaluar las señales con el objetivo de 100x, las preparaciones se visualizaron con los objetivos de 10x y 40x para identificar las áreas adecuadas para su valoración. Las señales se evaluaron, en cada caso, mediante la cuantificación del número de señales negras, debidas a copias únicas de la región cromosómica cubierta por la sonda MET, y de señales rojas, debidas a la sonda control, en un total de 20 núcleos bien definidos repartidos en dos áreas diferentes, calculándose el número medio de copias de *MET* y de copias centroméricas en cada tumor. El punto de corte para definir la amplificación génica de *MET* se estableció en ratio  $MET/CEP7 \geq 2$ , siendo dicho ratio la relación entre el número de señales del gen y el número de señales centroméricas. Asimismo, considerando el total de tumores evaluados, se calculó la mediana del número de copias de *MET* y de copias centroméricas. Los casos amplificados por SISH se confirmaron mediante análisis por FISH utilizando para ello la sonda comercial *Repeat-Free<sup>TM</sup> Poseidon<sup>TM</sup> C-MET (7q31)/SE 7*



(Kreatech), y siguiendo el protocolo previamente descrito para el análisis de la amplificación de *PIK3CA*. De forma similar, el punto de corte para definir la amplificación génica de *MET* por FISH también se estableció en  $\text{ratio} \geq 2$ , siendo dicho ratio la relación entre el número de señales del gen y el número de señales centroméricas.

#### 3.2.4.3. Estudio de alteraciones en los niveles de expresión proteica

El estudio de la expresión proteica de IGF-1R mediante IHQ se realizó con el anticuerpo CONFIRM IGF-1R Rabbit Monoclonal Primary Antibody (clon G11, prediluido; Ventana Medical Systems Inc., Roche Diagnostics, Mannheim, Germany). La técnica se realizó sobre secciones completas de 4  $\mu\text{m}$ .

La técnica IHQ, incluyendo el desparafinado y la recuperación antigénica, se realizó de forma automatizada en la plataforma *Benchmark ULTRA* (Ventana Medical System Inc.), siguiendo las indicaciones del fabricante y utilizando el protocolo de desenmascaramiento *cell conditioning 1* (CC1) estándar durante 64 minutos. Las condiciones de incubación del anticuerpo fueron 60 minutos a 37°C. La detección antigénica se realizó con *Ultraview Universal DAB Detection Kit*. Finalmente todas las preparaciones fueron contrateñidas con *Hematoxilin II* seguido de *Bluing Reagent*, durante 4 minutos, en ambos casos.

Todas las preparaciones fueron revisadas de forma independiente por dos patólogos (EC y FL-R). En base a puntos de cortes ya establecidos (Cappuzzo et al., 2006), a la hora de valorar la tinción IHQ se consideraron tanto el porcentaje de células tumorales inmunorreactivas (0-100%) como la intensidad de la tinción, estableciéndose cuatro categorías: 1+, ausencia de positividad para el anticuerpo; 2+, tinción débil; 3+, tinción moderada; y 4+, tinción intensa. Ambos valores se multiplicaron para obtener una puntuación final, comprendida entre 0 y 400, en función de la cual se estableció la positividad o negatividad de la expresión de IGF-1R. Como punto de corte se consideró el valor de 100, de tal manera que cualquier tinción IHQ de IGF-1R  $\geq 100$  se clasificó como positiva.

#### 3.2.5. Análisis estadístico

Se realizó un análisis comparativo entre las alteraciones genéticas y/o moleculares identificadas en el estudio de dianas terapéuticas y marcadores predictivos, las características clínicas de los pacientes y las características anatomopatológicas de los tumores. Para la comparación entre variables cuantitativas y cualitativas se emplearon el análisis *t*-test o *Anova*, en función del número de categorías establecidas para cada variable cualitativa. Según procediera, se utilizaron en su lugar los tests no paramétricos *U* de *Mann-Whitney* o *Kruskal-Wallis*, respectivamente. Por otro lado, la posible asociación entre las variables cualitativas se evaluó

mediante el test de contingencia Chi-Cuadrado, o el test exacto de *Fisher*, en el caso de que el tamaño muestral fuera inferior a cinco en alguna de las categorías. El nivel de significación estadístico se estableció en  $p < 0.05$ . El análisis se realizó con el programa estadístico SPSS/PASW versión 18.0 (del inglés *Statistical Package for Social Sciences*; Chicago, IL, USA).

Las diferencias en la supervivencia global en función de las alteraciones genéticas y/o moleculares identificadas se evaluaron mediante el método *Kaplan-Meier*, utilizando para ello el programa *R Development Core Team* versión 12.2.2 (<http://www.R-project.org/>; Viena, Austria). Se consideró igualmente el nivel de significación estadística en  $p < 0.05$ .

### 3.3. APROXIMACIONES METODOLÓGICAS AL ESTUDIO DE MARCADORES PREDICTIVOS EN CÁNCER: ANÁLISIS DE MUTACIONES EN *EGFR* EN CÁNCER DE PULMÓN

#### 3.3.1. Selección de casos

El estudio comparativo de métodos para determinar la presencia de mutaciones en el gen *EGFR* se realizó en una serie clínica prospectiva de 136 tumores FFPE de pacientes diagnosticados de NSCLCs en estadio avanzado entre los años 2008 y 2010, tras la obtención del correspondiente consentimiento informado. Los tumores fueron proporcionados por el Laboratorio de Dianas Terapéuticas del Hospital HM Universitario Sanchinarro. El análisis de mutaciones en *EGFR* se llevó a cabo tras petición por parte del Servicio de Oncología del citado hospital. Se dispuso de bloque tisular en todos los casos. Las muestras disponibles para el análisis fueron 86 (63%) piezas quirúrgicas, 43 (32%) biopsias broncoscópicas y siete (5%) biopsias con aguja gruesa. Las características histológicas de los tumores incluidos en el estudio fueron las siguientes: 87 (64%) ACs, 14 (10.3%) SCCs, 32 (23.5%) carcinomas NOS (del inglés, *not otherwise specified*), dos (1.5%) LCNEC y un (0.7%) LCC.

#### 3.3.2. Estudio de mutaciones en *EGFR*: metodologías

Para realizar el estudio de mutaciones en el gen *EGFR* se emplearon tres metodologías: secuenciación directa del producto de PCR, PCR cuantitativa en tiempo real e IHQ. A continuación se describe en profundidad cada una de las técnicas.

En el caso de los dos métodos basado en PCR fue necesario proceder a la extracción de ADN de cada uno de los tumores incluidos en los análisis. Previamente, se realizaron y tiñeron con H&E secciones representativas de los tumores para su revisión por dos patólogos (EC y FL-R), quienes realizaron el diagnóstico anatomopatológico, y evaluaron el porcentaje de celularidad

tumoral así como otras características histológicas, como la presencia de inflamación (considerada relevante si los linfocitos representaban >10% del tumor, valorados en campo 20x) o de mucina extracelular (considerada relevante si suponía >50% del tumor). Con el objetivo de enriquecer el porcentaje de celularidad tumoral así como eliminar áreas de necrosis, inflamación o mucina extracelular, se realizó, en función del material disponible para el estudio mutacional, macrodissección de los tumores siguiendo protocolos previamente descritos (Angulo et al., 2010). La extracción de ADN se realizó según protocolos ya descritos (Angulo et al., 2010), y la metodología empleada en el estudio de dianas terapéuticas y marcadores predictivos, que se ha detallado con anterioridad en el presente trabajo.

#### **3.3.2.1. Estudio de mutaciones en *EGFR* mediante secuenciación directa del producto de PCR**

La presencia de mutaciones en el gen *EGFR* (exones 18-21) se determinó, en primer lugar, mediante secuenciación directa del producto de PCR siguiendo protocolos previamente descritos (Conde et al., 2006), y según la metodología empleada en el estudio de los perfiles de expresión génica y en el estudio de dianas terapéuticas y marcadores predictivos en NSCLCs, que se ha detallado con anterioridad en el presente trabajo.

#### **3.3.2.2. Estudio de mutaciones en *EGFR* mediante PCR cuantitativa en tiempo real**

Como segundo método, se utilizó el kit *Therascreen EGFR Mutation Test* (Qiagen Manchester Ltd., Manchester, UK), que está diseñado para la detección de 29 de las mutaciones más frecuentes en *EGFR*: 19 deleciones en el exón 19, tres inserciones en el exón 20 y las mutaciones puntuales G719X (exón 18), S768I y T790M (exón 20), y L858R y L861Q (exón 21). El kit combina dos tecnologías: ARMS<sup>TM</sup> (Astrazeneca) y Scorpions<sup>TM</sup> (Qiagen Manchester Ltd.) para la detección de mutaciones mediante PCR cuantitativa en tiempo real (Newton et al., 1989; Whitcombe et al., 1999; Thelwell et al., 2000). La amplificación específica de alelo se consigue mediante la tecnología ARMS, que se basa en el empleo de un *primer* diseñado específicamente para ser complementario de la secuencia mutada y no de la secuencia *wild-type*, de tal manera que sólo en presencia de la mutación se producirá la unión entre *primer* y secuencia diana y tendrá lugar la amplificación del producto de PCR. La tecnología Scorpions, por su parte, permite detectar la amplificación del producto de PCR a través del incremento de la fluorescencia. El kit dispone de ocho ensayos diferentes, uno control para evaluar la calidad y cantidad del ADN analizado, y siete para detectar los diferentes tipos de mutaciones cubiertas por el kit (deleciones, inserciones y cada una de las cuatro mutaciones puntuales).

La amplificación se realizó siguiendo las indicaciones del fabricante en la plataforma ABI Prism 7300 (Applied Biosystems). El análisis de los resultados se basó en el cálculo de la diferencia de Cts,  $\Delta C_t$ , (del inglés, *cycle threshold*) entre el ensayo de la mutación correspondiente y el ensayo control, quedando definido el  $C_t$  como el ciclo de PCR a partir del cual se produce un incremento significativo de la señal de fluorescencia por encima del ruido de fondo. De esta manera, una muestra se clasificaría como mutada o *wild-type* para una de las mutaciones cubiertas por el kit en función de si dicho valor  $\Delta C_t$  queda por debajo o por encima del punto de corte establecido en los parámetros analíticos del kit.

### 3.3.2.3. Estudio de mutaciones en *EGFR* mediante inmunohistoquímica

La presencia de mutaciones en los exones 19 y 21 del *EGFR* también se estudió mediante IHQ, empleando para ello dos anticuerpos que reconocen específicamente algunas de las formas mutadas del receptor EGFR (Yu et al., 2009). Uno de los anticuerpos está dirigido frente a la delección de 15 nucleótidos E746-A750 en el exón 19 (clon 6B6, dilución 1:25; Cell Signaling Technology Inc., Danvers, MA, USA) y el otro detecta específicamente la mutación puntual L858R en el exón 21 (clon 43B2, dilución 1:100; Cell Signaling Technology Inc.). La técnica se realizó sobre secciones completas de 4 $\mu$ m, de forma automatizada en la plataforma *Benchmark XT* (Ventana Medical System Inc.), según las indicaciones del fabricante. Los protocolos de desenmascaramiento utilizados fueron CC1 estándar durante 60 minutos, y CC1 suave durante 30 minutos, respectivamente. Las condiciones de incubación fueron 32 minutos a temperatura ambiente, para el anticuerpo dirigido contra la delección del exón 19, y 92 minutos a 37°C, para el anticuerpo dirigido contra la mutación puntual en el exón 21. La detección antigénica en ambos casos se realizó con *Ultraview Universal DAB Detection Kit*. Finalmente todas las preparaciones fueron contrateñidas con *Hematoxilin II* seguido de *Bluing Reagent*, durante 4 minutos, en ambos casos.

La valoración de todas las preparaciones fue realizada por dos patólogos (EC y FL-R), de forma independiente y sin tener en consideración el estatus mutacional de *EGFR* establecido por cualquiera de los métodos anteriores. En base a puntos de corte ya establecidos (Brevet et al., 2010; Kawahara et al., 2010), se establecieron los siguientes criterios de valoración. En el análisis de la expresión de ambos anticuerpos se consideraron tanto la intensidad de la tinción citoplasmática y/o membranosa, como el porcentaje de células tumorales inmunorreactivas. Para la valoración de la intensidad se establecieron cuatro categorías: 0, en ausencia de positividad para el anticuerpo o si la tinción era débil y estaba presente en <10% de las células tumorales; 1+, si la tinción era débil y estaba presente en  $\geq$ 10% de las células tumorales; 2+, si las células tumorales presentaban una tinción moderada; y 3+, si las células tumorales presentaban una

tinción intensa. De esta manera, las categorías 0 y 1+ se clasificaron como negativas y las categorías 2+ y 3+ se clasificaron como positivas.

### **3.3.3. Estudio de sensibilidad**

Finalmente, tras la realización del análisis genético y utilizando todos los tumores mutantes para *EGFR* con ADN disponible, se evaluó la sensibilidad de los dos métodos basados en PCR. Para ello, se seleccionaron parejas de tumores con y sin mutaciones en *EGFR*, que tuvieran un porcentaje de celularidad tumoral similar y cuyo rendimiento en la extracción de ADN, en términos de cantidad y calidad, fuera comparable. En base a la experiencia previa (Angulo et al., 2010), se realizaron diluciones seriadas del ADN extraído de cada tumor mutante en ADN extraído de un tumor sin mutación, hasta que la proporción relativa de ADN mutante con respecto al ADN total a analizar representara el 1%, 3% y 5%, para su análisis con el kit *Therascreen EGFR Mutation Test*, y el 10%, 20%, 25% y 30%, para su análisis por secuenciación directa.

Para valorar la sensibilidad y la especificidad de los anticuerpos empleados en el análisis de mutaciones por IHQ, se compararon los resultados obtenidos con los de los métodos basados en PCR.

A modo de recapitulación, en la siguiente figura (Figura 4) se resume la metodología seguida en el desarrollo del presente trabajo. En ella se diferencian las dos etapas en las que se divide el trabajo: una primera etapa de descubrimiento en la que se ha realizado un estudio de perfiles de expresión génica; y una segunda etapa de traslado a la clínica en la que se ha realizado un estudio de alteraciones genéticas relevantes desde el punto de vista terapéutico para los carcinomas de pulmón, y un estudio comparativo de metodologías para el estudio de mutaciones en el gen *EGFR*. Asimismo quedan definidas las características de los tumores incluidos en las diferentes series sobre las que se ha realizado cada uno de los estudios, los métodos empleados y los marcadores analizados conforme a los objetivos planteados en cada caso.

**Figura 4. Resumen de Materiales y Métodos.** Se indican las características de los tumores incluidos en cada una de las series sobre las que se ha realizado el análisis de la expresión génica mediante *microarrays* (A), el estudio de diapas terapéuticas y marcadores predictivos (B), y el estudio comparativo de los métodos de determinación de mutaciones en el gen *EGFR* (C), así como la metodología seguida para cada análisis y los genes y/o proteínas estudiados en cada caso. FFPE: tejido fijado en formol e incluido en parafina; TMA: matriz tisular; PCR: reacción en cadena de la polimerasa; FISH: hibridación *in situ* fluorescente; ISH: hibridación *in situ* con plata; IHQ: inmunohistoquímica

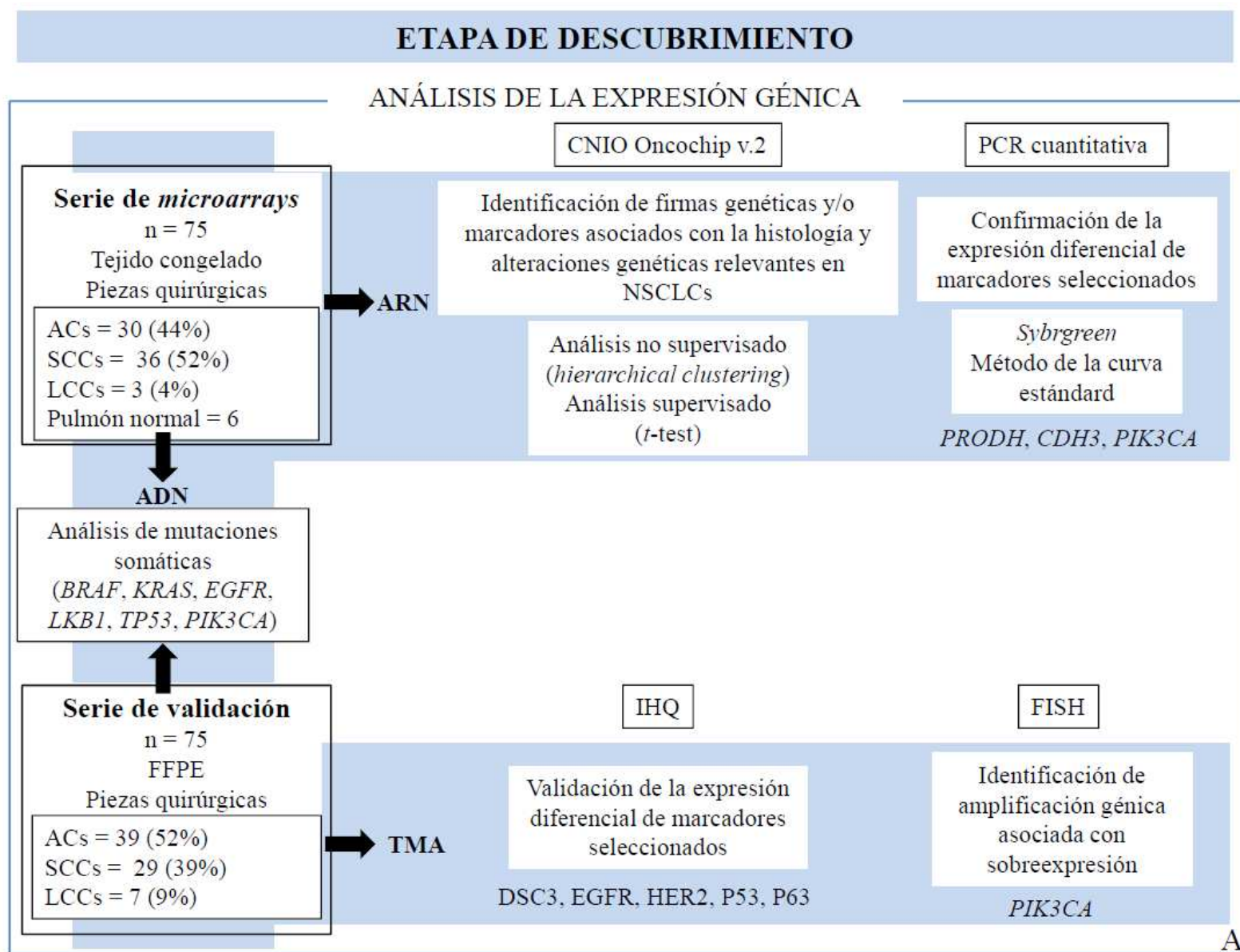
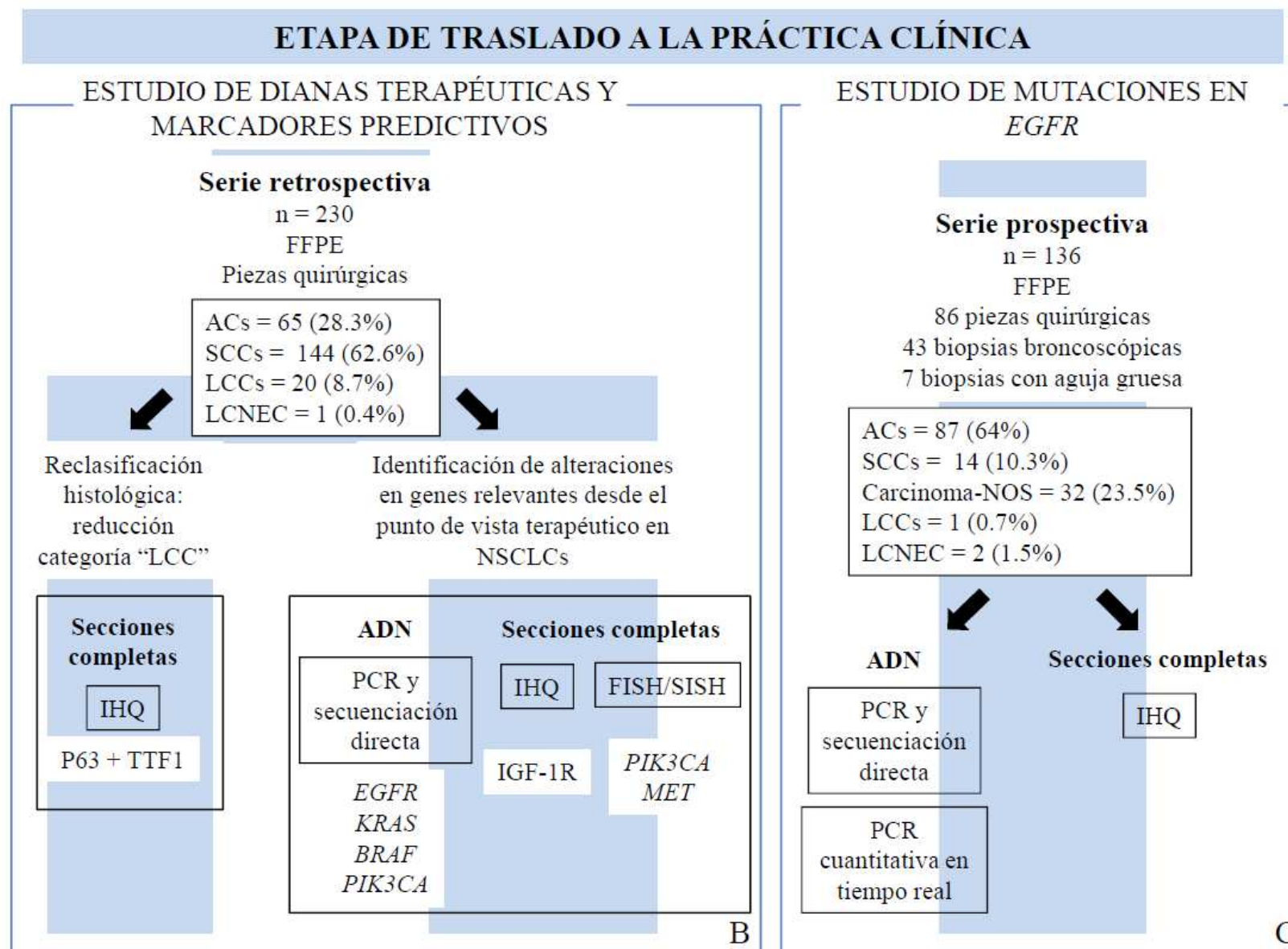


Figura 4. Resumen de Materiales y Métodos (continuación).







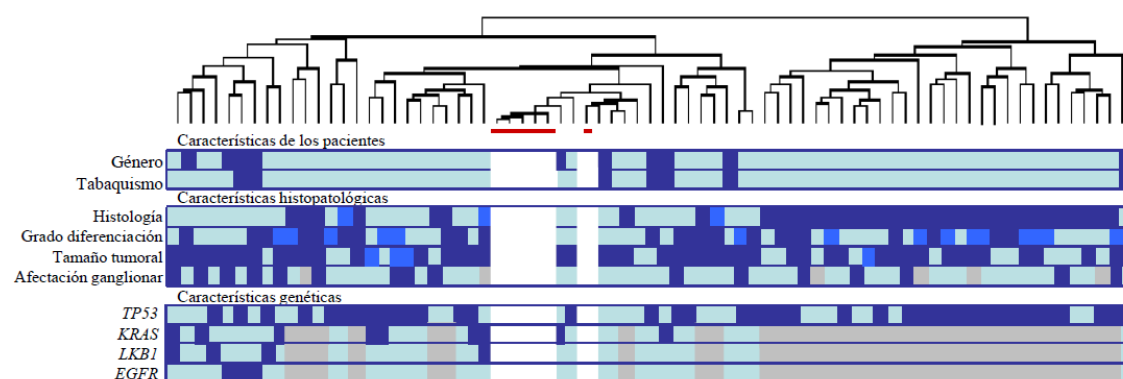
## **4. RESULTADOS**



#### 4.1. ANÁLISIS DE PERFILES DE EXPRESIÓN GÉNICA EN CARCINOMAS DE PULMÓN NO MICROCÍTICOS

##### 4.1.1. Análisis no supervisado: estudio de la agrupación de los tumores en función de los perfiles de expresión génica

Para analizar cómo se agrupan las muestras incluidas en el estudio de *microarrays* en función de sus perfiles de expresión génica se realizó un análisis no supervisado, empleando para ello los 1075 genes que mostraron una mayor expresión diferencial en los seis tejidos de pulmón normal y los 69 tumores de pacientes diagnosticados de NSCLC. En la Figura 5 se representa el dendrograma obtenido tras el análisis no supervisado de los datos de expresión. En él se muestra la agrupación de las muestras en base a las similitudes en los niveles de expresión de los genes analizados. Asimismo, se indican las características clínicas de los pacientes y de los tumores tales como el sexo, el hábito tabáquico, la histología, el tamaño tumoral, el grado de diferenciación, la afectación ganglionar y el estado mutacional para los genes seleccionados (*KRAS*, *EGFR*, *LKB1* y *TP53*).



**Figura 5. Análisis no supervisado: agrupación de los tumores en función de los perfiles de expresión génica.** Dendrograma que resulta del análisis no supervisado de los 69 tejidos tumorales y los seis tejidos normales de pulmón utilizando los perfiles de expresión de los 1075 transcritos más desregulados. Los tejidos normales se destacan en rojo. Las características de los pacientes y las características histopatológicas y genéticas de los tumores también aparecen indicadas. Los colores se corresponden con la siguiente leyenda: GRIS (ausencia de dato); AZUL OSCURO (mujer, no fumador, carcinoma epidermoide, tumor pobremente diferenciado, tamaño tumoral T2-T3, afectación ganglionar (N1-N2) y presencia de mutaciones en el gen indicado); AZUL CLARO (hombre, fumador, adenocarcinoma, tumor bien diferenciado, tamaño tumoral T1, sin afectación ganglionar y ausencia de mutaciones en el gen indicado); AZUL MEDIO (carcinoma de células grandes, tumor moderadamente diferenciado y tamaño tumoral T4).

Con respecto a las alteraciones genéticas y teniendo en cuenta el grupo de tumores en los que se analizaron cada uno de los genes, la frecuencia de mutaciones encontrada en la serie fue la siguiente: 3/30 (10%) para *EGFR*, 41/69 (59%) para *TP53*, y 9/30 (30%), para *KRAS*, no encontrándose, en cambio, ninguna mutación en el gen *BRAF*. Por su parte, la baja frecuencia de mutaciones en *LKB1* (3/30, 10%) en comparación con la descrita en la literatura se explica porque

la mayoría de los tumores mutantes para *LKB1* disponibles para su estudio se incluyeron en un análisis previo realizado con el objetivo de caracterizar la firma genética de los ACs portadores de alteraciones en dicho gen (Fernández et al., 2004).

En el dendrograma se observa una clara separación de los tumores en dos ramas según su tipo histológico, una rama que incluyó a la mayoría de los ACs y otra, al grueso de los SCCs (Figura 5). Así, en la rama de la derecha se agruparon 29 de los 30 ACs incluidos en la serie, además de los tres LCCs y ocho SCCs. Todos los tejidos no tumorales, excepto uno, quedaron incluidos en un mismo grupo dentro de la rama de los ACs. La revisión histológica de dicho tejido reveló un intersticio engrosado por la presencia de infiltrado inflamatorio y con hiperplasia alveolar, alteraciones que podrían justificar su separación del resto de tejidos normales. Dentro de la relativa heterogeneidad de esta rama del dendrograma, destaca que los tres ACs con mutaciones en el gen *EGFR* forman un grupo definido dentro de los ACs bien diferenciados. Por otra parte, la rama de la izquierda del dendrograma mostró una elevada homogeneidad en la medida que la mayoría de los SCCs incluidos en el estudio se agruparon en ella (28/36, 78%). No se observó una agrupación clara en ninguna de las ramas de tumores de acuerdo con el género, el hábito tabáquico, el tamaño tumoral, el grado de diferenciación, la afectación ganglionar las alteraciones genéticas distintas de las mutaciones en el gen *EGFR*.

#### **4.1.2. Análisis supervisado I: estudio de firmas genéticas asociadas con la histología de los carcinomas de pulmón no microcíticos**

Para identificar genes que mostraran una expresión diferencial entre los dos tipos histológicos más frecuentes dentro de estos NSCLCs y que, por tanto, pudieran considerarse marcadores asociados con la histología de los carcinomas de pulmón, se realizó un análisis supervisado comparando los perfiles de expresión génica de ACs (n=30) y SCCs (n=36). Tras la realización de este análisis se identificaron 193 genes diferencialmente expresados ( $FDR \leq 0.0005$ , Anexo B). Para seleccionar los genes a estudiar en mayor profundidad, se consideraron los siguientes criterios: (1) genes que mostraran una expresión homogénea dentro de cada tipo histológico, y (2) genes que presentaran una relación entre la expresión en ambos grupos del orden de  $\geq 4$  o  $\leq 0.25$ . Siguiendo estos criterios, el número de genes con una marcada expresión diferencial entre ACs y SCCs se redujo a 28 (Tabla 9 y Figura 6).

Tal y como se indica en la Tabla 9, la firma genética de los SCCs estaba constituida por 23 genes, que muestran una expresión significativamente mayor en este tipo histológico en comparación con la presentada por los ACs. Globalmente, los SCCs se caracterizaron por presentar altos niveles de expresión de genes implicados en los procesos de detoxificación y anti-oxidación (*GPX2*, *UGT1A6* o *ALDH3A1*, entre otros), genes como *DSC3* y *PKP1*, que codifican proteínas componentes de los desmosomas, una de las estructuras marcadoras de diferenciación

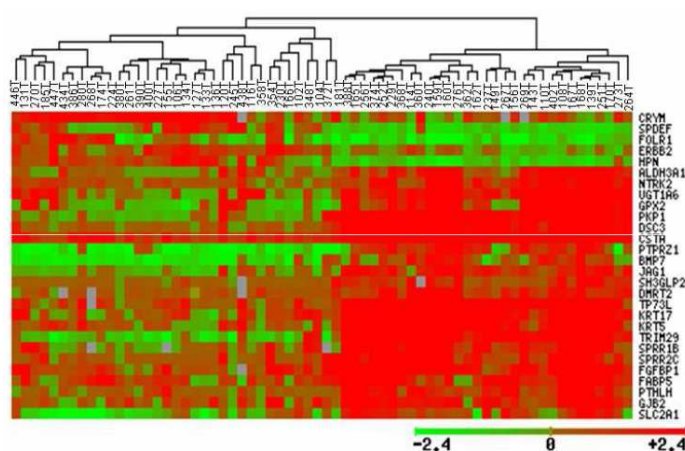
epidermoide, o como *TP73L/P63*, que codifica un factor de transcripción que juega una papel esencial en el desarrollo y el mantenimiento de los epitelios estratificados, por lo que también es considerado un marcador de diferenciación epidermoide.

**Tabla 9. Genes diferencialmente expresados con un ratio  $\geq 4$  o  $\leq 0.25$  (*t*-test) y un FDR  $\leq 0.0005$  que permiten la distinción entre SCCs y ACs.**

Nombre	Gene Bank Accesion No.	Descripción	N	SCC	AC	Relación expresión SCC vs AC
PKP1	AI081358	Plakophilin 1 (ectodermal dysplasia/skin fragility syndrome)	1.2	27	1	27
DSC3	R32665	Desmocollin 3	1	26	1.3	20
TP73L/P63	AA455929	Tumor protein p73-like	1.3	37	2	18
KRT17	H44051	Keratin 17 (epidermolysis bullosa simplex, Dowling-Meara, Koebner)	0.66	26	2	13
ALDH3A1	AI652557	Aldehyde dehydrogenase 3 family, member A1	1.4	15	1.3	11
KRT5	AA160507	Keratin 5 (epidermolysis bullosa simplex, Dowling-Meara/Kobner/Weber-Cockayne types)	1.3	20	1.8	11
CSTA	W72207	Cystatin A (stefin A)	8.3	37	3.3	11
TRIM29	AA055486	Tripartite motif-containing 29	0.7	9.2	0.9	10
NTK2	N63949	Neurotrophic tyrosine kinase, receptor, type 2	2.5	16	1.6	10
SPRR1B	AA447835	Small proline-rich protein 1B (cornifin)	1	17	1.9	9
SPRR2C	AA399674	Small proline-rich protein 2C	1.2	14	1.7	8
PTPRZ1	AA476460	Protein tyrosine phosphatase, receptor-type, Z polypeptide 1	0.4	3.2	0.4	8
FGFBP1	BE563742	Fibroblast growth factor binding protein 1	2.2	26	3.7	7
UGT1A6	T70999	UDP glucuronosyltransferase 1 family, polypeptide A9	1	19	3.5	5.4
BMP7	W73473	Bone morphogenetic protein 7 (osteogenic protein 1)	0.6	2.3	0.5	5
FABP5	N47717	Fatty acid binding protein 5 (psoriasis-associated)	6.1	9.8	2	5
GPX2	AA135289	Glutathione peroxidase 2 (gastrointestinal)	0.6	8.1	1.7	5
PTH1H	AA845432	Parathyroid hormone-like hormone	0.8	6.4	1.3	5
JAG1	R70685	Jagged 1 (Alagille syndrome)	1.4	4.1	0.9	4.5
SH3GLP2	AA417252	SH3-domain GRB2-like pseudogene 2	ND	4.7	1.1	4.3
DMRT2	W93861	Doublesex and mab-3 related transcription factor 2	ND	5.3	1.4	4
GJB2	AA490688	Gap junction protein, beta 2, 26kDa (connexin 26)	0.7	7.6	2	4
SLC2A1	H58873	Solute carrier family 2 (facilitated glucose transporter), member 1	0.1	2.8	0.7	4
CRYM	R67147	Crystallin, nm	3.4	1.9	7.4	0.25
SPDEF	AI745526	SAM pointed domain containing ets transcription factor	0.5	0.7	2.6	0.25
FOLR1	BE900714	Folate receptor 1 (adult)	4.5	0.5	2	0.25
ERBB2	AA443351	V-erbB2 erythroblastic leukemia viral oncog hom 2, neuro/glioblastoma derived oncog hom (avian)	1.5	1.1	4.6	0.24
HPN	H62162	Hepsin (transmembrane protease, serine 1)	1.6	0.6	2.6	0.23

Se indica el nivel medio de expresión de los genes seleccionados en cada tipo histológico y en pulmón normal (N), así como la relación entre su expresión en ambos grupos (SCC *versus* AC).

ND: sin datos de expresión.



**Figura 6. Análisis supervisado: identificación de marcadores asociados con la histología de los NSCLCs.** Representación de la agrupación de los tumores en base a los niveles de expresión de los genes que mostraron mayores diferencias de expresión entre SCCs y ACs. La escala refleja la mayor (rojo) o menor (verde) expresión de cada gen.

Con el objetivo de validar las diferencias observadas en la expresión génica relacionadas con la histología de los ACs y los SCCs, se seleccionaron, en base a la disponibilidad de anticuerpos comerciales, los marcadores DSC3, TP73L/P63 (P63) y HER2 para su análisis por IHQ en la serie independiente de 75 NSCLCs. Asimismo se valoró la expresión de las proteínas EGFR y P53. Los resultados del análisis inmunohistoquímico de estos marcadores se resumen en la siguiente tabla (Tabla 10). Como puede observarse, se encontró una fuerte correlación entre el tipo histológico epidermoide y la expresión de las proteínas DSC3 (Figura 7) y P63. Por su parte, la expresión de P53 también se asoció con este tipo histológico, además de con la presencia de mutaciones en el gen *TP53*. Otra de las observaciones destacadas fue la mayor expresión de EGFR en los SCCs, mientras que un mayor número de ACs se caracterizó por expresar HER2.

**Tabla 10. Distribución de la tinción inmunohistoquímica de las proteínas DSC3, EGFR, HER2, P53 y P63 en los NSCLCs de acuerdo con su histología y la presencia o ausencia de mutaciones en los genes indicados**

	Histología (n=68)		EGFR* (n=39)		TP53 (n=75)		KRAS* (n=39)	
	SCC n (%)	AC n (%)	MUT n (%)	WT n (%)	MUT n (%)	WT n (%)	MUT n (%)	WT n (%)
<b>DSC3</b>								
0	9 (31)	37 (95)	6 (100)	30 (94)	12 (57)	37 (77)	6 (100)	31 (94)
1	20 (69)	2 (5)	0 (0)	2 (6)	9 (43)	11 (23)	0 (0)	2 (6)
	(p < 0.001)				(p < 0.14)			
<b>EGFR</b>								
0	3 (11)	20 (53)	3 (50)	17 (55)	7 (33)	18 (39)	3 (50)	17 (53)
1	25 (89)	18 (47)	3 (50)	14 (45)	17 (67)	28 (61)	3 (50)	15 (47)
	(p < 0.005)							
<b>HER2</b>								
0	29 (100)	34 (87)	5 (83)	28 (88)	19 (90)	45 (94)	5 (83)	29 (88)
1	0 (0)	5 (13)	1 (17)	4 (12)	2 (10)	3 (6)	1 (17)	4 (12)
	(p < 0.05)							
<b>P53</b>								
0	9 (31)	26 (67)	3 (50)	22 (69)	5 (24)	31 (65)	5 (83)	21 (64)
1	20 (69)	13 (33)	3 (50)	10 (31)	16 (76)	17 (35)	1 (17)	12 (36)
	(p < 0.01)				(p < 0.01)			
<b>P63</b>								
0	7 (24)	29 (74)	3 (50)	25 (78)	7 (33)	31 (65)	6 (100)	23 (70)
1	13 (45)	9 (23)	3 (50)	6 (19)	10 (48)	11 (23)	0 (0)	9 (27)
2	9 (31)	1 (3)	0 (0)	1 (3)	4 (19)	6 (12)	0 (0)	1 (3)
	(p < 0.001)				(p < 0.1)			

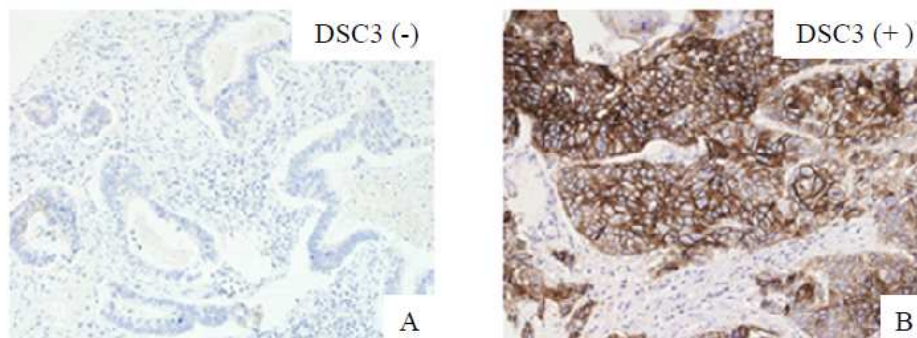
\* El análisis de mutaciones en los genes *EGFR* y *KRAS* se realizó únicamente en los ACs, mientras que el análisis de mutaciones en el gen *TP53* se hizo en la serie completa.

MUT: mutado, WT: *wild-type*.

#### 4.1.3. Análisis supervisado II: estudio de firmas genéticas características de alteraciones en genes relevantes en carcinomas de pulmón no microcíticos

Para identificar firmas genéticas o marcadores que pudieran correlacionarse con la presencia de mutaciones en genes relevantes para la carcinogénesis pulmonar se realizó un análisis supervisado. De los genes sobre los que se realizó el análisis de mutaciones, se seleccionaron para este estudio *EGFR*, *KRAS* y *TP53*. Como se ha indicado con anterioridad en el

presente trabajo, la comparación de los perfiles de expresión génica entre ACs con y sin mutaciones en el gen *LKB1* no se realizó al estar ya descrita (Fernández et al., 2004). Asimismo, tampoco se pudo analizar la expresión de genes relevantes para diferenciar subgrupos de tumores definidos por la presencia de alteraciones en el gen *BRAF*, al no identificarse ninguna mutación en los tumores incluidos en la serie de *microarrays*.



**Figura 7. Tinción inmunohistoquímica de DSC3.** Ejemplos representativos de un NSCLC negativo (A) y otro positivo (B) para DSC3. Se consideró positividad para DSC3 cuando  $\geq 10\%$  de las células tumorales fueron inmunorreactivas (400x).

Debido a la necesidad de disponer de ARN de calidad para el estudio de la expresión génica mediante *microarrays*, sólo se pudieron incluir tres ACs con mutaciones en el gen *EGFR*. A pesar de este bajo número, se encontró que estos tumores presentaban un perfil de expresión marcadamente diferente al de los tumores no mutados para *EGFR*. Después de restringir el criterio de selección a genes que mostraran una variación de su expresión entre tumores con y sin mutaciones en *EGFR* del orden de  $\geq 4$  o  $\leq 0.25$  y un FDR  $\leq 0.05$ , se encontraron 13 genes diferencialmente expresados, entre los que se incluyó, a pesar de no cumplir estrictamente los criterios de selección, al gen *ERBB3*, por pertenecer a la misma familia que *EGFR* (Tabla 11A). De los genes diferencialmente expresados, *PRODH*, *PCDHA6*, *WBPI* y el propio *EGFR* mostraban unos niveles de expresión significativamente mayores en los ACs portadores de mutaciones en *EGFR*. Por su parte, *XBPI*, *PRKARIA*, *PDCD4* y *PTPN11* se encontraron altamente expresados en los tumores no mutados. Globalmente se observó que los ACs portadores de mutaciones en el gen *EGFR* se caracterizaron por presentar desregulación de la expresión de genes implicados en los procesos celulares de transducción de señales y apoptosis.

Asimismo, se trataron de identificar firmas genéticas que pudieran correlacionarse con la presencia de mutaciones en los genes *TP53* o *KRAS*. No se encontró ningún gen diferencialmente expresado con una relación entre su expresión en ambos grupos (mutados *versus* *wild-types*) mayor de 2.5 y un FDR  $\leq 0.05$ . Tras ampliar los criterios de selección a genes que mostraran una diferencia en los niveles de expresión del orden de  $>2$  o  $<0.5$  y un FDR  $<0.2$ , se encontraron seis genes diferencialmente expresados al comparar ACs con y sin mutaciones en el gen *TP53*. Entre



ellos destacó *CDH3*, que presentaba un nivel de expresión cuatro veces superior en los ACs con *TP53* mutado (Tabla 11B). Asimismo, se consideró al propio gen *TP53* entre los genes diferencialmente expresados, a pesar de no cumplir estrictamente los criterios de selección, por sus implicaciones biológicas. Ningún gen mostró una expresión diferencial según estos criterios al considerar el estatus mutacional de *TP53* en la serie completa de tumores o en el subgrupo de SCCs. De forma similar, ningún gen presentó una expresión diferencial estadísticamente significativa cuando se compararon los perfiles de expresión de ACs portadores o no de mutaciones en el gen *KRAS*.

**Tabla 11. Genes diferencialmente expresados que permiten la distinción entre carcinomas de pulmón con (MUT) y sin mutaciones (WT) en los genes *EGFR* (A) y *TP53* (B).**

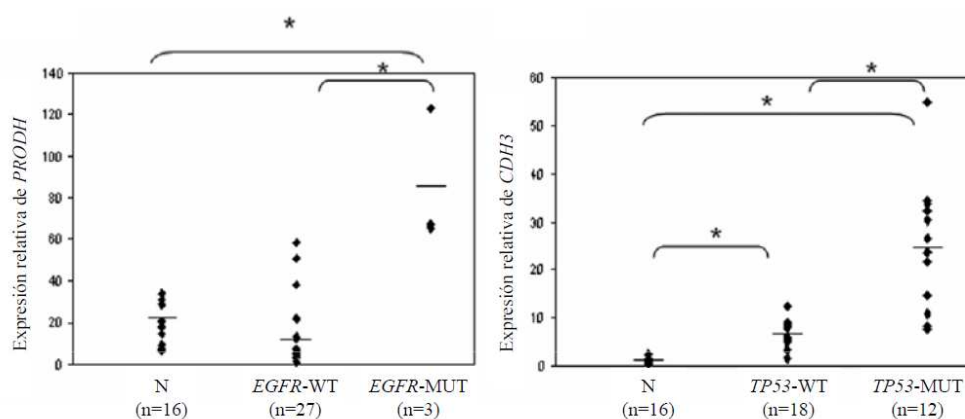
Nombre	Gene Bank Acc. No.	Descripción	N	MUT	WT	Relación expresión MUT vs WT
<b>A. Genes diferencialmente expresados con un ratio <math>\geq 4</math> o <math>\leq 0.25</math> y FDR <math>\leq 0.05</math> en adenocarcinomas de pulmón con y sin mutaciones en el gen <i>EGFR</i></b>						
PRODH	BX281261	Proline dehydrogenase (oxidase) 1	8.5	28.5	3.8	7.7
PCDHA6	R49274	Protocadherin alpha subfamily C, 1	1.3	10.3	1.8	5.7
WBP1	AA968514	WW domain binding protein 1	1.3	5.9	1.3	4.5
EGFR	W48713	Epidermal growth factor receptor (erythroblastic leukemia viral (v-erb-b) oncogene homolog, avian)	1.3	4.9	1.2	4
<i>ERBB3</i>	<i>AA664212</i>	<i>V-erb-b2 erythroblastic leukemia viral oncogene homolog 3 (avian)</i>	1	3.3	1.4	2.5
APG5L	N95381	ATG5 autophagy related 5 homolog (S. cerevisiae)	0.9	0.3	1.3	0.23
TGFB14	AA398237	TSC22 domain family, member 1	2.1	0.3	1.3	0.23
PLAUR	BE386005	Plasminogen activator, urokinase receptor	2.2	0.5	2.2	0.22
IL8RA	BF001579	Interleukin 8 receptor, alpha	2	0.6	2.8	0.21
PTPN11	AA609602	Protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 11 (Noonan syndrome 1)	0.7	0.1	0.5	0.2
PDCD4	W01536	Programmed cell death 4 (neoplastic transformation inhibitor)	1.2	0.2	1	0.2
PRKAR1A	N25969	Protein kinase, cAMP-dependent, regulatory, type I, alpha (tissue specific extinguisher	1.7	0.2	1	0.2
XBP1	W90128	X-box binding protein 1	0.7	0.2	1.2	0.17
<b>B. Genes diferencialmente expresados con un ratio <math>\geq 2.5</math> o <math>\leq 0.4</math> y FDR <math>\leq 0.2</math> en adenocarcinomas de pulmón con y sin mutaciones en el gen <i>TP53</i></b>						
CDH3	AA425556	Cadherin 3, type 1, P-cadherin (placental)	1.1	8.5	2.2	4
HSPA2	BE259102	Heat shock 70kDa protein 2	1.2	2.8	1	2.8
PLAU	AA284668	Plasminogen activator, urokinase	0.8	3.4	1.3	2.6
<i>TP53</i>	<i>R39356</i>	<i>Tumor protein p53 (Li-Fraumeni syndrome)</i>	0.5	0.8	0.5	1.7
NNMT	T72235	Nicotinamide N-methyltransferase	4	2.1	5	0.4
PTPRN2	AA464590	Protein tyrosine phosphatase, receptor type, N polypeptide 2	1.3	0.7	1.6	0.4

Se indica el nivel medio de expresión de los genes seleccionados en pulmón normal (N) y en cada uno de los dos grupos comparados: tumores mutados (MUT) y *wild-types* (WT) para *EGFR* (A) o *TP53* (B), así como la relación entre su expresión en ambos grupos (MUT *versus* WT).

Las diferencias de expresión observadas en función de las alteraciones genéticas de los tumores se confirmaron midiendo los niveles de expresión en los tumores incluidos en la serie de *microarrays* mediante una técnica independiente: PCR cuantitativa en tiempo real (Figura 8). Para ello, se seleccionaron los marcadores que mostraron una mayor expresión diferencial según el estatus mutacional del gen correspondiente: *PRODH*, en el caso de *EGFR*, y *CDH3*, en el caso de *TP53*. Comparados con la expresión de *TBP*, los niveles de expresión de *PRODH* resultaron significativamente menores en pulmón normal (media 21.0; desviación estándar (DE)  $\pm$  9.86) y en tumores sin alteraciones en el gen *EGFR* (media 12.3; DE  $\pm$  16.0) en comparación con los



tumores mutantes (media 85.2; DE  $\pm$  32.50) ( $p < 0.0001$ ), confirmando así los resultados del análisis de *microarrays*. De forma similar, los ACs mutantes para *TP53* mostraron una expresión significativamente mayor de *CDH3* (media 24.7; DE  $\pm$  12.50) en comparación con los tumores no mutados (media 6.4; DE  $\pm$  3.11) y el pulmón normal (media 0.9; DE  $\pm$  0.50) ( $p < 0.0001$ ). Curiosamente, los niveles de expresión de *CDH3* también fueron significativamente mayores en los tumores no mutantes con respecto a los niveles presentes en pulmón normal ( $p < 0.0001$ ).



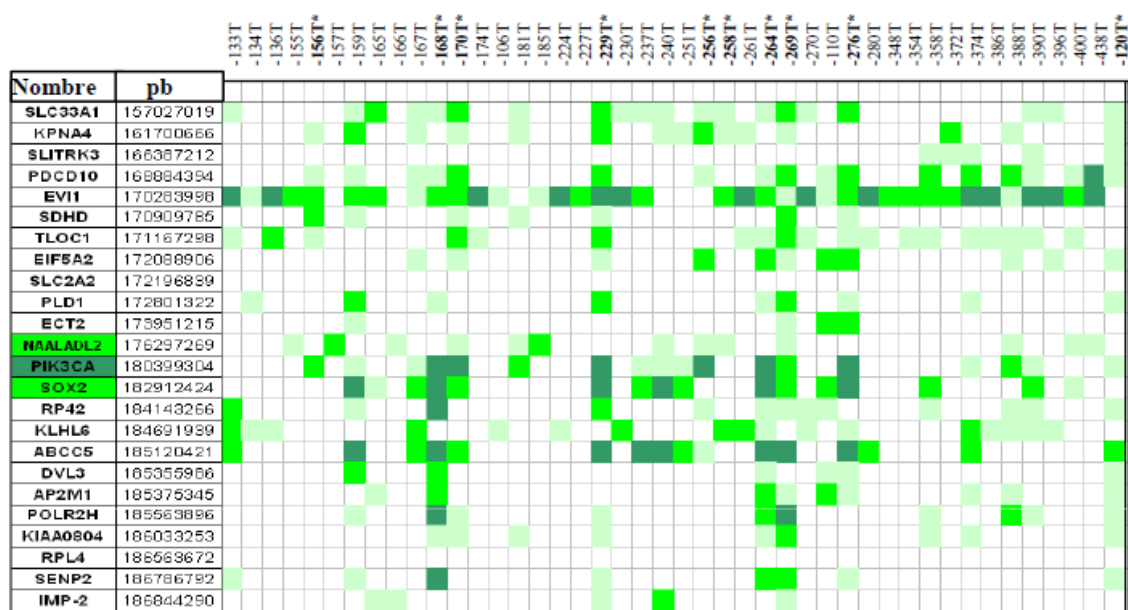
**Figura 8. Expresión diferencial de marcadores asociados con alteraciones genéticas relevantes para la carcinogénesis pulmonar.** Se muestran los niveles de expresión de *PRODH* (A) y *CDH3* (B), relativos a *TBP*, medidos por PCR cuantitativa en tiempo real, en ACs con (MUT) y sin mutaciones (WT) para el gen considerado (*EGFR* y *TP53*, respectivamente), y en tejido pulmonar normal (N). La barra muestra el valor medio del nivel de expresión del gen seleccionado en cada grupo. El nivel de significación estadística ( $p < 0.0001$ ) se representa con un asterisco (\*).

#### 4.1.4. Análisis de la sobreexpresión y la amplificación del gen *PIK3CA*

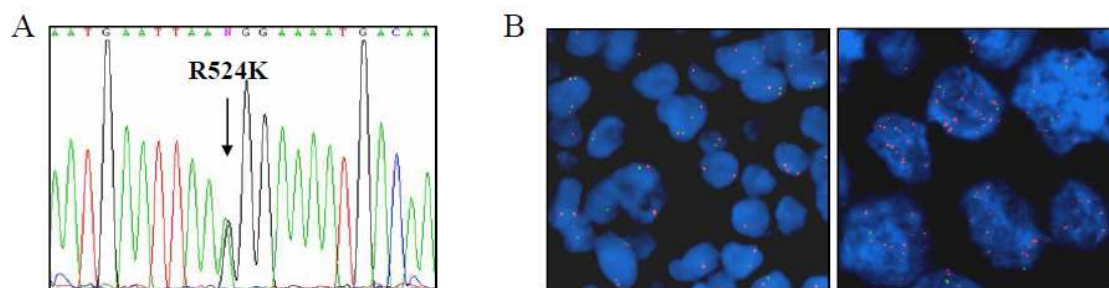
Tras organizar los datos de expresión génica por la posición que ocupa cada uno de los genes en el cromosoma, se encontró un grupo de genes en la región 3q26, entre los que se incluía *PIK3CA*, que mostraban altos niveles de expresión, lo que sugería la posible existencia de un amplicón en dicha región (Figura 9). Curiosamente, *PIK3CA* fue uno de los genes sobreexpresados en SCCs, siendo su nivel de expresión dos veces superior al presentado por ACs (Anexo B). Teniendo en consideración los resultados obtenidos y que, en base a la literatura, *PIK3CA* es un oncogén reconocido y la amplificación de la región 3q26 es una de las más comunes en cáncer de pulmón, se planteó la posibilidad de que el aumento en los niveles de expresión de *PIK3CA* observado podía ser consecuencia de su amplificación génica.

Para ello, se analizaron por FISH 81 NSCLCs, 50 de los cuales formaban parte del grupo de tumores incluidos en el estudio *microarrays*, perteneciendo los 31 restantes a la serie de validación. Además, con el fin de completar el estudio de las alteraciones genéticas que afectan a *PIK3CA* en NSCLCs, se realizó un análisis mutacional de dicho gen en esta serie de tumores. Con respecto al análisis de mutaciones (Figura 10A), se encontraron dos: una de las cuales (E545K) se

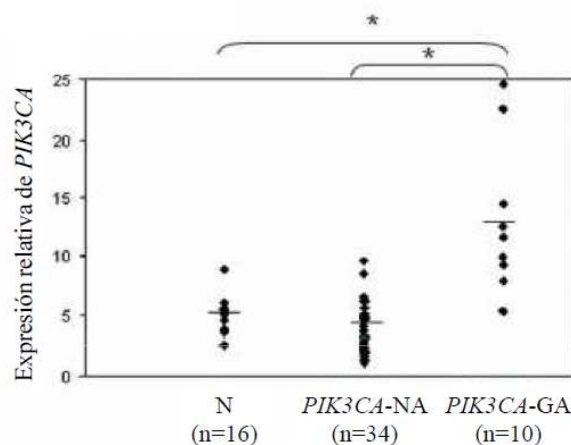
identificó en un SCC, mientras que la otra mutación (R524K) se encontró en un AC. En total, el porcentaje de mutaciones somáticas en *PIK3CA* en la presente serie fue del 2.5%. Con respecto al estudio de la amplificación génica, tras el análisis de FISH, se pudieron valorar 72 de los 81 tumores analizados, estando disponibles los datos de expresión para 44 de ellos (Figura 9). En base a los niveles de expresión de *PIK3CA* establecidos en el análisis de *microarrays*, sólo los tumores con un número de copias de *PIK3CA* superior a 7 mostraban un incremento concomitante en la expresión génica. Así, los tumores pudieron clasificarse en tres categorías: (1) tumores con dosis normal de *PIK3CA*, si el número de copias del gen por núcleo era  $<4$ ; (2) tumores con incremento en el número de copias o ganancia de *PIK3CA*, si tenían entre 4 y 7 copias del gen por núcleo; y (3) tumores con amplificación génica de *PIK3CA*, si el número de copias por núcleo era  $>7$ . Siguiendo este criterio, 47 (65%) tumores mostraron una dosis normal, nueve (13%) tumores presentaron un incremento en el número de copias; y se detectó amplificación génica de *PIK3CA* en 16 (22%) tumores (Figura 10B).



**Figura 9. Sobreexpresión génica en la región cromosómica 3q26.** Detalle de la región 3q26 donde se muestran los niveles de expresión de los genes localizados según su posición cromosómica en los 44 tumores analizados por FISH y con datos de expresión disponibles. El color verde oscuro indica un nivel de expresión relativa  $>4$ ; el color verde intermedio, 2-4; el color verde claro, 1.5-2; y el color blanco,  $<1.5$ . Los tumores con amplificación génica de *PIK3CA*, confirmada por FISH, se destacan en negrita y con un asterisco (\*). pb: pares de bases, indica la posición cromosómica.



La correlación existente entre la amplificación génica y el incremento en los niveles de expresión de *PIK3CA* fue confirmada por PCR cuantitativa en tiempo real en los tumores incluidos en la serie de *microarrays* sobre los que se realizó el análisis de FISH. Comparada con los niveles de expresión de *TBP*, la expresión de *PIK3CA* fue mayor en los tumores con amplificación génica (media 12.6; DE  $\pm$  6.36) que en aquellos sin amplificación (media 3.8; DE  $\pm$  2.04) ( $p < 0.0001$ ) y en pulmón normal (media 4.9; DE  $\pm$  1.53) ( $p < 0.0001$ ) (Figura 11), destacando además que la expresión de *PIK3CA* en tumores sin amplificación génica fue similar a la encontrada en pulmón normal ( $p > 0.05$ ).



**Figura 11. Correlación existente entre amplificación y sobreexpresión de *PIK3CA*.** Se muestran los niveles de expresión de *PIK3CA* relativos a *TBP*, medidos por PCR cuantitativa, en tejido normal de pulmón (N) y en tumores con amplificación (GA) y sin (NA) amplificación de *PIK3CA*. La barra muestra el nivel medio de expresión del gen en cada grupo. El nivel de significación estadística ( $p < 0.0001$ ) se representa con un asterisco (\*).

Además de *PIK3CA*, otros genes incluidos en la región 3q26 podrían ser considerados dianas del amplicón caracterizado. Uno de ellos era *P63*, que como se ha indicado anteriormente

en el presente trabajo, es uno de los genes que muestran una marcada sobreexpresión en SCCs. No obstante, no se encontró correlación alguna entre la amplificación de dicha región y niveles elevados de la proteína P63. Entre los tumores que presentaron amplificación por FISH, sólo el 31% presentaba niveles altos de proteína P63, lo que indica que, al menos con la sonda utilizada en este estudio para analizar la amplificación génica de la región 3q26 por FISH, *P63* no representa la diana del amplicón.

Dada la prevalencia de las alteraciones en el gen *PIK3CA* en NSCLCs, se trataron de identificar marcadores o firmas genéticas que pudieran correlacionarse con la presencia de las mismas mediante un análisis supervisado. De forma similar a lo observado para los genes *TP53* y *KRAS*, no se encontraron genes diferencialmente expresados con una relación entre su expresión en ambos grupos mayor de 2.5 y con un nivel de significación estadística de  $FDR \leq 0.05$ . Tras ampliar los criterios de selección a un  $FDR < 0.2$  y una relación entre la expresión en ambos grupos del orden de  $>2$  o  $<0.5$ , se encontraron ocho genes diferencialmente expresados, incluyendo al propio gen *PIK3CA* (Tabla 12). Entre los genes con un nivel de expresión disminuido en los tumores con alteraciones en *PIK3CA*, en comparación con los tumores que no las presentaban, destacaron *DUSP5* y *PTPRU*, que codifican dos fosfatasa, y *ERFII*, que codifica un regulador negativo de la vía de señalización activada por EGF.

**Tabla 12. Genes diferencialmente expresados que permiten la distinción entre carcinomas de pulmón con y alteraciones (amplificación génica o mutaciones) en el gen *PIK3CA*.**

Nombre	Gene Bank Acc. No.	Descripción	N	MUT	WT	Relación expresión
						MUT vs WT
PIK3CA	W72473	Phosphoinositide-3-kinase, catalytic, alpha polypeptide	1.2	3	1.3	2.3
ACTL6A	AA410394	Actin-like 6A	0.45	2	0.95	2.1
HISTIH4B	AI218900	Histone cluster I, H4b	0.5	1.8	0.8	2.1
ZNF367	AI571004	Zinc finger protein 367	0.2	0.8	0.4	2
QPRT	BE299670	Quinolate phosphoribosyltransferase (nicotinate-nucleotide pyrophosphorylase (carboxylating))	0.3	0.3	0.6	0.5
PTPRU	BM667857	Protein tyrosine phosphatase receptor type U	1.3	0.6	1.3	0.46
DUSP5	W65461	Dual specific phosphatase	1.4	1	2.4	0.42
ERFII	N39305	ERBB receptor feedback inhibitor I	0.9	0.46	1.65	0.26

Se indica el nivel medio de expresión de los genes seleccionados en pulmón normal (N) y en cada uno de los dos grupos comparados: tumores con alteraciones (MUT) y tumores sin alteraciones (WT) en el gen *PIK3CA*, así como la relación entre su expresión en ambos grupos (MUT versus WT).

Por otra parte, se encontró una fuerte asociación entre la amplificación génica de *PIK3CA* y el tipo histológico epidermoide. Sólo uno de los 34 ACs (3%) en comparación con 14 de los 33 SCCs (42%) ( $p < 0.001$ ) mostró amplificación génica. Asimismo, sólo uno de los cinco LCCs analizados estaba amplificado. Por otro lado, no se encontró correlación alguna entre la amplificación de *PIK3CA* y cualquier otra característica de los pacientes o de los tumores, tales como el género, el hábito tabáquico, el tamaño tumoral, el grado de diferenciación, la afectación ganglionar o la presencia de mutaciones en los genes analizados.

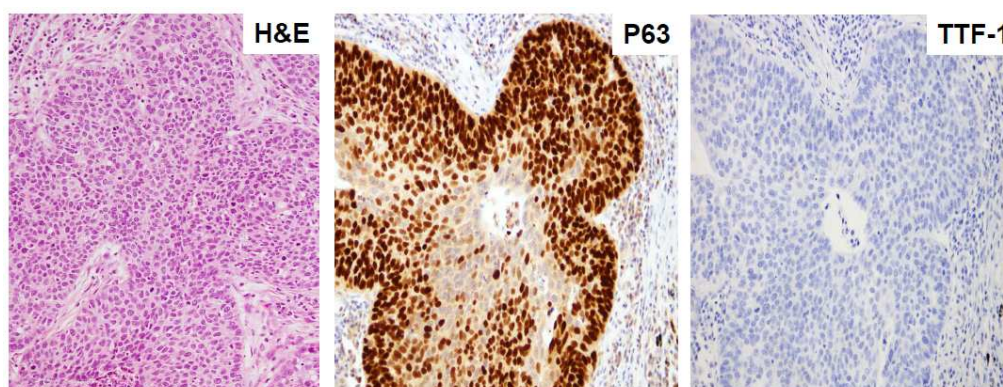
#### 4.1. ESTUDIO DE DIANAS TERAPÉUTICAS Y MARCADORES PREDICTIVOS EN CARCINOMAS DE PULMÓN NO MICROCÍTICOS

##### 4.2.1. Valor de la expresión proteica de P63 en la clasificación histológica de los carcinomas de pulmón no microcíticos

En base a los resultados obtenidos tras la comparación de los perfiles de expresión génica entre ACs y SCCs mediante *microarrays*, y la consiguiente confirmación de P63 como marcador que permite discriminar entre ambos tipos histológicos, se eligió para evaluar la utilidad de su tinción IHQ a la hora de reclasificar los 20 LCCs incluidos en la serie de NSCLCs donde se realizó el estudio de dianas terapéuticas y marcadores predictivos. Además de dicho marcador, se utilizó TTF1 ya que los datos publicados demuestran la ausencia de expresión del mismo en SCCs.

La mitad de los 20 LCCs (50%) resultaron positivos para P63 y se reclasificaron consecuentemente como SCCs (Tabla 13). Con la excepción de dos casos, todos los tumores positivos para P63 no expresaron TTF1 (Figura 12). De los ocho tumores restantes que mostraron positividad para TTF1, siete fueron reclasificados como ACs. Se identificaron signos de diferenciación neuroendocrina (células en empalizada, necrosis y alto índice mitótico, entre otros) en tres de los LCCs incluidos en la serie, diferenciación que fue confirmada mediante la tinción IHQ de los marcadores neuroendocrinos sinaptofisina y CD56, por lo que se reclasificaron como carcinomas de células grandes neuroendocrinos. Estos tres carcinomas fueron negativos para P63 y sólo uno de ellos mostró positividad para TTF1.

Tras esta reclasificación, las características histológicas de los tumores incluidos en la serie donde se realizó el estudio de dianas terapéuticas y marcadores predictivos fueron las siguientes: 72 (31.3%) ACs, 154 (67%) SCCs y cuatro (1.7%) LCNECs.



**Figura 12. Tinción inmunohistoquímica de P63 y TTF1.** Ejemplo de LCC reclasificado como SCC al mostrar un patrón de expresión mutuamente excluyente: positividad para P63 y negatividad para TTF1 (200x). Se consideró positividad para P63 cuando la tinción nuclear era intensa en  $\geq 50\%$  de las células tumorales, y positividad para TTF1 cuando la tinción nuclear era intensa en  $\geq 5\%$  de las células tumorales.



**Tabla 13. Reclasificación de LCCs en base al patrón de expresión de P63 y TTF1**

Muestra	Diagnóstico inicial	P63	TTF-1	Diagnóstico final
1	LCC	Positivo	Positivo	SCC
2	LCC	Negativo	Positivo	AC
3	LCC	Positivo	Negativo	SCC
4	LCC	Positivo	Negativo	SCC
5	LCC	Negativo	Negativo	LCC neuroendocrino
6	LCC	Negativo	Positivo	AC
7	LCC	Positivo	Positivo	SCC
8	LCC	Positivo	Negativo	SCC
9	LCC	Negativo	Positivo	LCC neuroendocrino
10	LCC	Positivo	Negativo	SCC
11	LCC	Negativo	Positivo	AC
12	LCC	Positivo	Negativo	SCC
13	LCC	Positivo	Negativo	SCC
14	LCC	Negativo	Positivo	AC
15	LCC	Negativo	Negativo	LCC neuroendocrino
16	LCC	Negativo	Positivo	AC
17	LCC	Negativo	Positivo	AC
18	LCC	Positivo	Negativo	SCC
19	LCC	Negativo	Positivo	AC
20	LCC	Positivo	Negativo	SCC

#### 4.2.2. Análisis de dianas terapéuticas y marcadores predictivos en carcinomas de pulmón no microcíticos

A continuación se detallan los resultados del estudio de dianas terapéuticas y marcadores predictivos en NSCLCs, agrupándolos por el tipo de alteración que presentan cada uno de los marcadores analizados, e indicando en cada caso la frecuencia y el tipo de alteraciones encontradas, el contexto genético-molecular en el que aparecen y la correlación con características clínico-patológicas de los tumores.

##### 4.2.2.1. Estudio de alteraciones de secuencia

En base a la disponibilidad de ADN, el estudio mutacional de los genes *EGFR*, *KRAS*, *BRAF* y *PIK3CA* se realizó en 178 de los 230 tumores incluidos en la serie (51 ACs, 123 SCCs y 4 LCNECs).

La frecuencia y el tipo de alteraciones identificadas en cada uno de los genes analizados se detallan en las Tablas 14 y 15, y se muestran ejemplos representativos de las mismas en la Figura 13. Tras el análisis por secuenciación directa del producto de PCR de los exones 18, 19, 20 y 21 del gen *EGFR* se encontraron tres mutaciones en el exón 19 (5.9%), una de ellas correspondía a la delección típica de 15 nucleótidos E746-A750, mientras que las otras dos correspondían a las consideradas delecciones complejas al implicar un cambio de nucleótido adyacente a la secuencia de nucleótidos perdida. El análisis de mutaciones del gen *KRAS* reveló la

presencia de siete mutaciones en el codón 12 (13.7%), siendo interesante destacar que la mayoría de las mutaciones identificadas (86%) supusieron una transversión tipo G a T [G12V (GGT>GTT), G12C (GGT>TGT)]. La frecuencia de mutaciones de *BRAF* encontrada fue relativamente baja, sólo dos de los tumores analizados presentaron una alteración en este gen. Una de ellas se identificó en el exón 11 (G466A, GGA>GCA), mientras que la otra se encontró en el exón 15 (D594H, GAT>CAT), ambos cambios producidos como consecuencia de transversiones tipo G a C. Se identificaron doce mutaciones en el gen *PIK3CA*, la mayoría de ellas (11/12, 92%) localizadas en los codones caracterizados como puntos calientes o *hot spots* para este gen en cáncer (545, 542 y 1047). Como puede verse en la Tabla 15, las mutaciones en *PIK3CA* afectaron más frecuentemente al exón 9 (7/12, 58%).

**Tabla 14. Frecuencia de mutaciones en los genes *EGFR*, *KRAS*, *BRAF* y *PIK3CA* identificadas en la serie de tumores incluidos en el estudio de diana terapéuticas y marcadores predictivos en NSCLCs**

<i>EGFR</i> n=51 <sup>a</sup>		<i>KRAS</i> n=51 <sup>a</sup>		<i>BRAF</i> n=49 <sup>a,*</sup>		<i>PIK3CA</i> n=174 <sup>b,*</sup>	
MUT	WT	MUT	WT	MUT	WT	MUT	WT
3	48	7	44	2	47	12	162
5.9%		13.7%		4.1%		6.9%	

<sup>a</sup> El análisis de los genes *EGFR*, *KRAS* y *BRAF* se realizó únicamente en los ACs.

<sup>b</sup> El análisis del gen *PIK3CA* se realizó en todos los tumores de la serie.

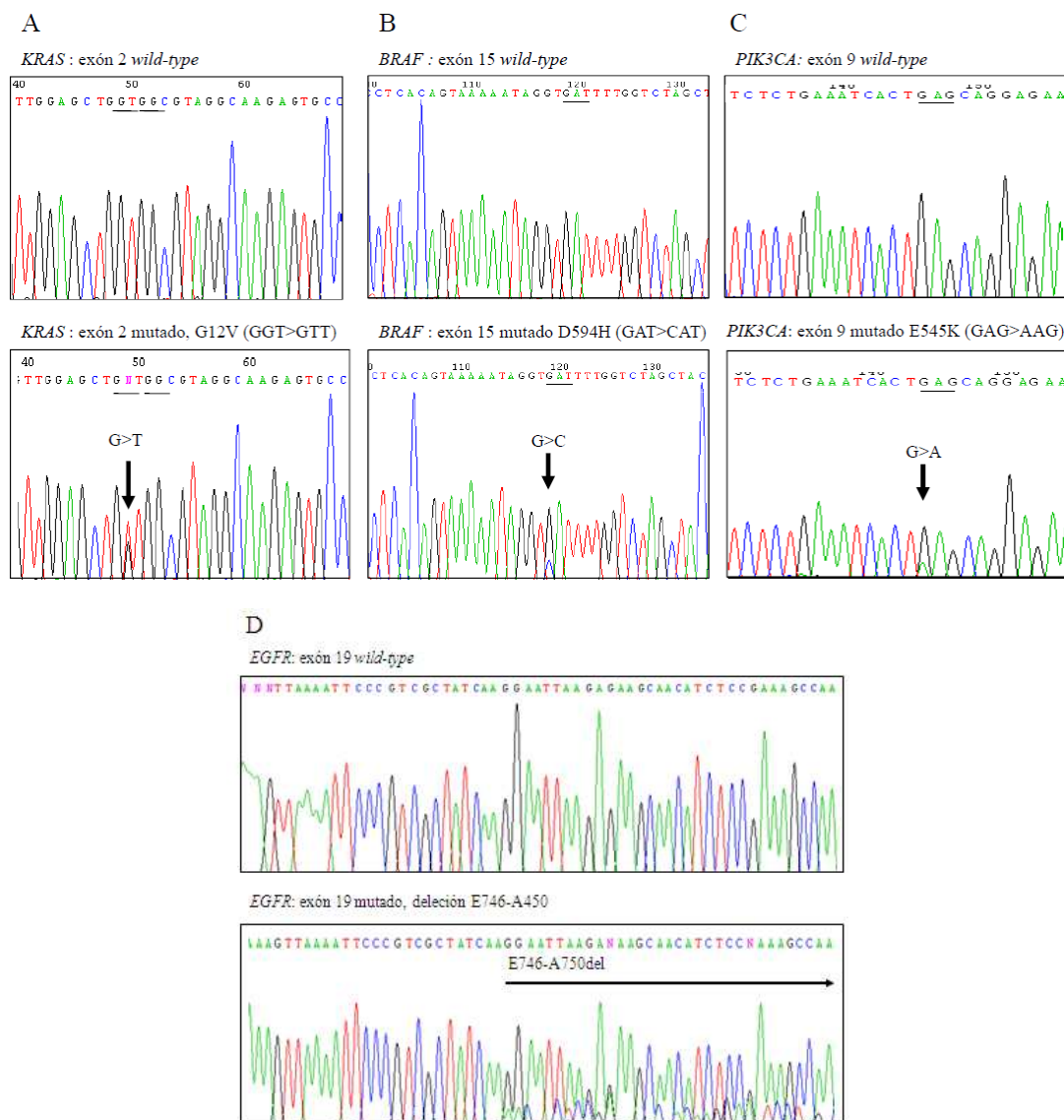
\* Algunos de los tumores no pudieron ser analizados por secuenciación directa: dos ACs, en el caso de *BRAF*, y un SCC y tres ACs, en el caso de *PIK3CA*.

MUT: mutado

WT: *wild-type*.

**Tabla 15. Tipos y distribución de las mutaciones en los genes *EGFR*, *KRAS*, *BRAF* y *PIK3CA* identificadas en el estudio dianas terapéuticas y marcadores predictivos en NSCLCs**

Gen	Exón	Cambio de aminoácido	NSCLC
<i>EGFR</i>	19	deleción E746-A750	1
	19	deleción L747-A750>P	1
	19	deleción L747-P753>S	1
	Total		3 (5.9%)
<i>KRAS</i>	2	G12V	4
	2	G12C	2
	2	G12D	1
	Total		7 (13.7%)
<i>BRAF</i>	11	G466A	1
	15	D594H	1
	Total		2 (4.1%)
<i>PIK3CA</i>	9	E545K	4
	9	E542K	3
	20	H1047R	4
	20	M1043I	1
	Total		12 (6.9%)



**Figura 13. Estudio de dianas terapéuticas y marcadores predictivos en NSCLCs: análisis de mutaciones.** Ejemplos representativos de mutaciones en los genes *KRAS* (A), *BRAF* (B), *PIK3CA* (C) y *EGFR* (D). En todos los casos, en la parte superior se muestra el electroferograma correspondiente a la secuencia nativa o *wild-type* de un tumor, y en la parte inferior el electroferograma correspondiente a la secuencia mutada de otro tumor. Obsérvese que la presencia de la mutación correspondiente se evidencia por la existencia de una doble secuencia y que en todos los casos el alelo *wild-type* predomina sobre el alelo mutado.

Al analizar el contexto genético de las alteraciones identificadas se encontró que ninguno de los tumores presentaba simultáneamente mutaciones en los genes *KRAS*, *EGFR* y *BRAF*. Sólo uno de los ACs analizados presentó una mutación en el gen *PIK3CA*, no encontrándose en dicho tumor mutaciones en ninguno de los otros genes estudiados.

La correlación entre las mutaciones analizadas y diversas características clínicas de los pacientes y anatomopatológicas de los tumores se reflejan en la Tabla 16. A pesar de que el número de tumores analizados y de mutaciones encontradas en cada uno de los genes no permitieron alcanzar el nivel de significación estadística, se encontró que la incidencia de mutaciones en *EGFR* fue mayor en mujeres y en pacientes no fumadores, a diferencia de lo



observado con las mutaciones de *KRAS* y *BRAF*, que fueron más frecuentes en hombres y en pacientes fumadores. En relación con las características clínico-patológicas de las mutaciones de *PIK3CA* no se encontró ninguna correlación con el sexo o el hábito tabáquico, siendo interesante constatar la fuerte correlación existente entre la presencia de mutaciones en el gen *PIK3CA* y el tipo histológico epidermoide, ya que 11 de las 12 mutaciones identificadas se encontraron en SCCs frente a solo una mutación en ACs.

**Tabla 16. Relación entre características clínico-patológicas y mutaciones en los genes analizados en la serie de tumores incluidos en el estudio dianas terapéuticas y marcadores predictivos en NSCLCs**

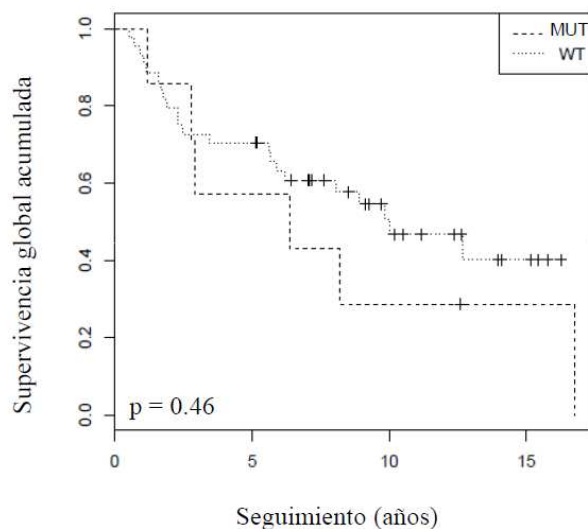
		<i>EGFR</i>			<i>KRAS</i>			<i>BRAF</i>			<i>PIK3CA</i>		
		Wild-type (n=48) n (%)	Mutado (n=3) n (%)	<i>p</i>	Wild-type (n=44) n (%)	Mutado (n=7) n (%)	<i>p</i>	Wild-type (n=47) n (%)	Mutado (n=2) n (%)	<i>p</i>	Wild-type (n=162) n (%)	Mutado (n=12) n (%)	<i>p</i>
<b>Sexo</b>	Hombres	39 (81.2)	1 (33.3)	0.114	34 (77.3)	6 (85.7)	1	37 (78.7)	2 (100)	1	149 (92)	12 (100)	0.603
	Mujeres	9 (18.8)	2 (66.7)		10 (22.7)	1 (14.3)		10 (21.3)	0 (0)		13 (8)	0 (0)	
<b>Edad</b>	Media	63.7	66.3	0.857	63.5	65.8	0.837	63.6	69.5	0.324	64.9	61.7	0.162
	DE	9.9	9.2		10.3	4.8		9.7	0.7		8.4	7.2	
<b>Hábito tabáquico*</b>	No fumador	10 (21.7)	2 (66.7)	0.144	10 (23.3)	2 (33.3)	0.626	11 (23.9)	0 (0)	1	13 (8.2)	0 (0)	1
	Fumador	36 (78.3)	1 (33.3)		33 (76.7)	4 (66.7)		35 (76.1)	2 (100)		145 (91.8)	11 (100)	
<b>Histología</b>	AC	48 (100)	3 (100)		44 (100)	7 (100)		47 (100)	2 (100)		47 (29)	1 (8.3)	0.237
	SCC		NA			NA			NA		111 (68.5)	11 (91.7)	
	LCNEC		NA			NA			NA		4 (2.5)	0 (0)	
<b>Grado de diferenciación*</b>	Bien	18 (62.1)	2 (100)	0.555	17 (63)	3 (75)	0.819	19 (65.5)	0 (0)	0.229	49 (47.1)	5 (62.5)	0.440
	Moderado	2 (6.9)	0 (0)		2 (7.4)	0 (0)		2 (6.9)	0 (0)		19 (18.3)	2 (25)	
	Pobre	9 (31)	0 (0)		8 (29.6)	1 (25)		8 (27.6)	1 (100)		36 (34.6)	1 (12.5)	

\*Característica desconocida para alguno de los tumores analizados.

DE: desviación estándar.

NA: no analizado.

El análisis de la supervivencia en relación con la presencia de mutaciones en los genes analizados mostró que la presencia de mutaciones en el gen *KRAS* parece asociarse con un peor pronóstico, si bien el tamaño muestral no permitió alcanzar la significación estadística (Figura 14). El resto de las alteraciones genéticas no parecieron conferir ningún significado pronóstico estadísticamente significativo en los NSCLCs analizados. No obstante, al comparar la supervivencia libre de progresión, en el grupo de pacientes que experimentaron recidiva, o la supervivencia global, en el grupo de pacientes muertos, se encontró que la supervivencia libre de progresión en los pacientes con mutaciones en el gen *PIK3CA* era significativamente menor que la mostrada por los pacientes que no presentaban mutaciones en dicho gen (6.17 frente a 22.88 meses,  $p = 0.038$ ) (Tabla 17). Por otra parte, aunque no se alcanzó la significación estadística, debido al bajo número de pacientes que recidivaron o murieron, al comparar el estatus mutacional del gen *BRAF*, es interesante destacar que tanto la supervivencia libre de progresión como la supervivencia global fueron marcadamente inferiores en aquellos pacientes que mostraban mutaciones en el gen *BRAF* (Tabla 17).



**Figura 14. Curva de supervivencia en función del estatus mutacional del gen *KRAS*.** Supervivencia de pacientes con mutaciones (MUT) y sin mutaciones (WT) en el gen *KRAS*. La mediana de la supervivencia en los pacientes con mutaciones en el gen *KRAS* (n=7) fue de 6.38 años frente a los 10.02 años en pacientes con *KRAS* wild-type (n=44). La diferencia no fue estadísticamente significativa (p=0.46).

**Tabla 17. Análisis de la recidiva, supervivencia libre de progresión y supervivencia global en relación con la presencia de mutaciones en los genes *EGFR*, *KRAS*, *BRAF* y *PIK3CA***

		<i>EGFR</i>			<i>KRAS</i>			<i>BRAF</i>			<i>PIK3CA</i>		
		Wild-type (n=48) n (%)	Mutado (n=3) n (%)	p	Wild-type (n=44) n (%)	Mutado (n=7) n (%)	p	Wild-type (n=47) n (%)	Mutado (n=2) n (%)	p	Wild-type (n=162) n (%)	Mutado (n=12) n (%)	p
Recidiva*	Si	24 (50)	0	0.238	20 (45.5)	4 (57.1)	0.693	22	1 (50)	1	51	3 (25)	0.775
	No	24 (50)	3 (100)		24 (54.5)	3 (42.9)		25	1 (50)		109	9 (75)	
Supervivencia libre de progresión (meses) <sup>1</sup>	Media	23.20	N.D	0.642	25.14	13.49	0.642	24.38	4.66	0.175	29.88	6.17	0.038
	Mediana	13.39	N.D		13.39	13.01		13.39	4.66		16.66	6.18	
	DE	23.85	N.D		25.59	7.87		24.55	N.D		28.29	1.67	
	Rango	0.95-84.5	N.D		0.95-84.48	4.47-23.47		0.95-84.48	N.D		0.95-121.21	4.5-7.85	
Supervivencia global (meses) <sup>2</sup>	Media	56.56	N.D	0.370	51.68	74.45	0.370	59.54	6.12	0.095	66.36	59.48	0.555
	Mediana	32.23	N.D		28.65	55.76		38.17	6.12		64.79	50.86	
	DE	49.78	N.D		43.56	70.17		50.36	N.D		48.03	58.81	
	Rango	6.12-201.14	N.D		6.12-152.22	14.33-201.14		8.53-201.14	N.D		5.42-201.14	10.52-154.92	

\*Característica desconocida para alguno de los tumores analizados.

<sup>1</sup> La supervivencia libre de progresión está calculada únicamente para los pacientes que experimentaron recidiva.

<sup>2</sup> La supervivencia global está calculada únicamente para los pacientes muertos (*KRAS*: seis en el grupo mutado, 22 en el grupo wild-type; *BRAF*: uno en el grupo mutado, 26 en el grupo wild-type; *PIK3CA*: cinco en el grupo mutado, 68 en el grupo wild-type).

DE: desviación estándar.

ND: valor no determinado, bien porque ninguno de los pacientes experimentaron recidiva o murieron (*EGFR*), o bien porque sólo había un paciente que recidivó o murió (*BRAF*).

#### 4.2.2.2. Estudio de alteraciones en el número de copias

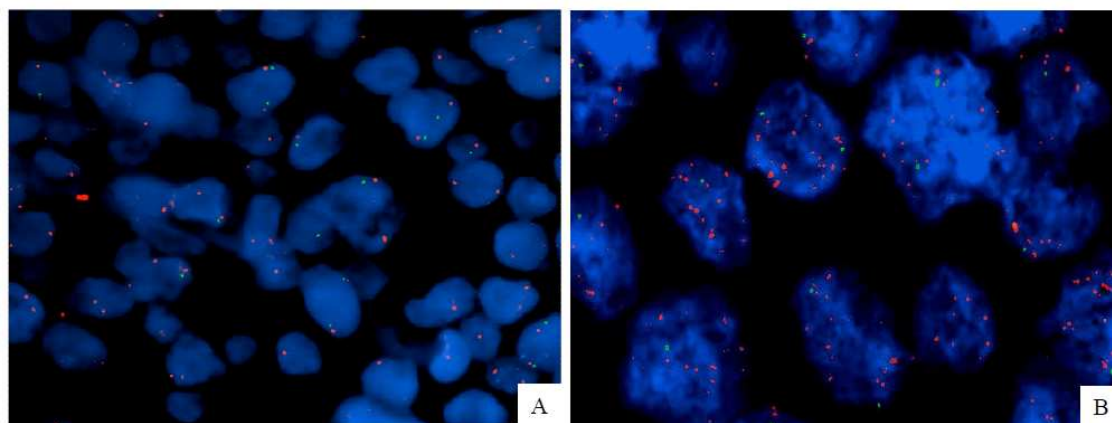
En base a lo descrito en la literatura y a los resultados obtenidos previamente en el estudio de *microarrays* para el análisis de la expresión génica, el estudio de la amplificación del gen *PIK3CA* mediante técnica de FISH se realizó exclusivamente en los 123 SCCs de la serie con

ADN disponible para la realización de estudios moleculares, obteniéndose resultados valorables en 116 de estos tumores. Utilizando como punto de corte el ratio  $PIK3CA/CEP3 \geq 2$ , se identificó la presencia de amplificación del gen *PIK3CA* en 44 (38%) tumores (Tabla 18 y Figura 15). Además es interesante destacar que se detectó la presencia de polisomía en 14 carcinomas, considerando como polisómicos aquellos tumores en los que los núcleos presentaban de media tres o más señales centroméricas (Tabla 18).

**Tabla 18. Estudio de la amplificación del gen *PIK3CA* mediante técnica de FISH**

FISH	<i>PIK3CA</i>	SCC n=116*	
Positivo	Amplificado	44	38%
Negativo	No amplificado	58	62%
	Polisómico	14	

\* Siete tumores no pudieron ser analizados por FISH.



**Figura 15. Amplificación del gen *PIK3CA* estudiada mediante técnica de FISH.** Se muestra un SCC sin amplificación (A) y otro tumor con amplificación del gen *PIK3CA* (B). Obsérvese en la imagen B cómo la amplificación del gen se evidencia por el incremento en el número de señales rojas debidas a copias únicas del gen *PIK3CA*, mientras que el número de señales centroméricas de control del cromosoma 3 (verde) se mantiene en dos en cada uno de los núcleos evaluados.

Al calcular la media del número de copias de *PIK3CA* en los tumores analizados se encontró que era de 5.7 (rango = 2.2-21). En el subgrupo de tumores amplificados, la media estaba próxima a nueve, mientras que en los tumores no amplificados fue inferior a cuatro (Tabla 19). Es interesante destacar que, en ocho de los tumores que mostraban amplificación, ésta fue especialmente marcada ya que el número de copias más de dos veces superior a la media identificada en la serie completa. En base a estos resultados, se comprobó que todos los tumores clasificados como amplificados en base al ratio  $PIK3CA/CEP3 \geq 2$  presentaban más de cinco copias de *PIK3CA* por núcleo y, curiosamente, el 61% (27/44) de los tumores amplificados tenían siete o más copias del gen. Por otro lado, entre los tumores no amplificados, el 64% (46/72) mostraba menos de cuatro copias de *PIK3CA* por núcleo. Ambos hallazgos confirmaron los

resultados previamente obtenidos en la serie sobre la que se realizó el análisis de la expresión génica y en donde se establecieron como puntos de cortes para definir la presencia o ausencia de amplificación en un número de copias de *PIK3CA* mayor a siete o inferior a cuatro, respectivamente.

**Tabla 19. Análisis del número de copias del gen *PIK3CA***

Número de copias <i>PIK3CA</i>	Análisis FISH <i>PIK3CA</i>		
	Total n=116*	Amplificado n=44	No amplificado n=72
Media	5.7	8.7	3.8
DE	3.3	3.8	1.06

\* Siete tumores no pudieron ser analizados por FISH.  
DE: desviación estándar.

Al comparar la presencia de mutaciones en *PIK3CA* con la amplificación del gen se encontró que ambas alteraciones no eran mutuamente excluyentes. No obstante, es interesante señalar que los tumores con mutaciones en *PIK3CA* no siempre mostraron amplificación, sólo en tres (2.6%) de los 115 SCCs en los que pudieron realizarse los dos análisis se detectó la presencia de ambas alteraciones (Tabla 20). Al comparar el tipo de mutación, cabe destacar que el 43% (3/7) de las mutaciones en el exón 9 se detectaron en tumores con amplificación del gen *PIK3CA*, mientras que ninguna de las mutaciones identificadas en el exón 20 se dieron de forma concomitante con la amplificación del gen.

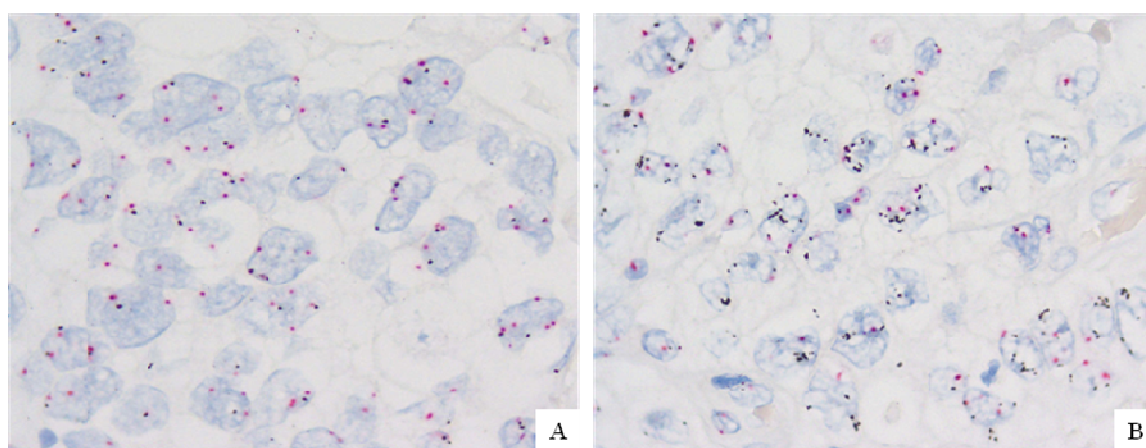
**Tabla 20. Relación entre la presencia de mutaciones y amplificación del gen *PIK3CA***

Análisis mutaciones <i>PIK3CA</i>		Análisis FISH <i>PIK3CA</i>		
		Amplificado	No amplificado	Total
	Mutado	3	8	11
	Wild-type	40	64	104
	Total	43	72	115

El estudio de la amplificación del gen *MET* mediante técnica de SISH (Figura 16) se realizó en 108 de los tumores con tejido disponible para llevar a cabo esta técnica y de los que había ADN para la realización de estudios moleculares, incluyendo 60 SCCs y 48 ACs. En la Tabla 21 se detallan los resultados obtenidos por tipo histológico al comparar cuatro criterios de interpretación diferentes, siendo estos criterios los siguientes:

- Criterio Cappuzzo: se consideró positividad cuando la media del número de copias de *MET* por núcleo era  $\geq 5$  (Cappuzzo et al., 2009).

- Criterio *University of Colorado Cancer Center* (UCCC): la positividad para *MET* puede deberse indistintamente a la amplificación génica en base al ratio *MET/CEP7*  $\geq 2$ , a la presencia de más de 15 copias de *MET* en  $>10\%$  de las células tumorales, a la presencia de pequeños grupos o *clusters* de señales debidas al gen *MET* (4-10 copias) o de grandes *clusters* (en los que no es posible contar el número de copias de *MET*) en  $>10\%$  de células tumorales, o a la presencia de elevada polisomía en  $\geq 40\%$  de las células tumorales (Go et al., 2010).
- Ratio SISH *MET/CEP7*, considerándose amplificación del gen *MET* si el ratio era  $\geq 2$ .
- Número de copias del gen *MET*. Al calcular la mediana del número de copias de *MET* por núcleo en la serie analizada se encontró que era igual a 3.075 (rango = 1.8-17.5), por lo que se consideró positividad si el número de copias de *MET* en el tumor era  $\geq 3.075$ .



**Figura 16. Amplificación del gen *MET* estudiada mediante técnica de SISH.** Se muestra un NSCLC sin amplificación (A) y otro tumor con amplificación del gen *MET* (B). Obsérvese en la imagen B cómo la amplificación del gen se evidencia por el incremento en el número de señales negras debidas a copias únicas del gen *MET*, mientras que el número de señales centroméricas de control del cromosoma 7 (rojo) se mantiene en dos en cada uno de los núcleos evaluados.

Tomando como punto de corte la mediana del número de copias, un total de 54 (50%) tumores fueron positivos para *MET*. Entre estos tumores se incluían cinco (4.6%) que mostraban una amplificación verdadera en base al ratio SISH *MET/CEP7*  $\geq 2$ , amplificación que fue confirmada mediante técnica de FISH. La amplificación de *MET* se identificó tanto en ACs como en SCCs (tres y dos tumores, respectivamente), si bien es interesante destacar que mientras los primeros presentaron una elevada amplificación, con ratio  $>3$  (media = 5.03, mediana = 4.94 y DE  $\pm 0.85$ ), los SCCs mostraron una amplificación más moderada, con ratio  $\leq 3$  (media = 2.42, mediana = 2.42 y DE  $\pm 0.35$ ).



**Tabla 21. Estudio de la amplificación del gen *MET* mediante técnica de SISH: resumen de los criterios de interpretación en la serie completa de tumores y por tipo histológico**

	Total (n=108) n (%)	AC (n=48) n (%)	SCC (n=60) n (%)	<i>p</i>
<b>Criterio 1 (Cappuzzo)<sup>1</sup></b>				
Positivo	19 (17.6)	11 (22.9)	8 (13.3)	0.21
Negativo	89 (82.4)	37 (77.1)	52 (86.7)	
<b>Criterio 2 (UCCC)<sup>2</sup></b>				
Positivo	46 (42.6)	22 (45.8)	24 (40)	0.56
Negativo	62 (57.4)	26 (54.2)	36 (60)	
<b>Criterio 3 (ratio SISH <i>MET/CEP7</i>)<sup>3</sup></b>				
Positivo	5 (4.6)	3 (6.3)	2 (3.3)	0.65
Negativo	103 (95.4)	45 (93.7)	58 (96.7)	
<b>Criterio 4 (número de copias <i>MET</i>)<sup>4</sup></b>				
Positivo	54 (50)	24 (50)	30 (50)	>0.99
Negativo	54 (50)	24 (50)	30 (50)	

<sup>1</sup> Criterio Cappuzzo (media del número de copias de *MET* por núcleo  $\geq 5$ ).

<sup>2</sup> Criterio UCCC (ratio *MET/CEP7*  $\geq 2$ , >15 copias de *MET* por núcleo en >10% de células tumorales, grupos de señales en >10% de células tumorales, elevada polisomía en  $\geq 40\%$  de células tumorales).

<sup>3</sup> Criterio ratio SISH *MET/CEP7*  $\geq 2$ .

<sup>4</sup> Criterio número de copias de *MET* por núcleo  $\geq 3.075$ .

Por otro lado, la comparación de los valores del ratio SISH *MET/CEP7* y del número de copias del gen *MET* entre los dos grupos de tumores definidos por cada uno de los criterios considerados en la valoración de la amplificación de *MET* se muestra en la Tabla 22.

**Tabla 22. Comparación del ratio SISH *MET/CEP7* y del número de copias del gen *MET* entre los grupos definidos por los criterios seguidos en la valoración de la amplificación del gen *MET***

	Criterio 1 (Cappuzzo) <sup>1</sup>		Criterio 2 (UCCC) <sup>2</sup>		Criterio 3 (ratio SISH <i>MET/CEP7</i> ) <sup>3</sup>		Criterio 4 (número de copias <i>MET</i> ) <sup>4</sup>	
	Positivo (n=19)	Negativo (n=89)	Positivo (n=46)	Negativo (n=62)	Positivo (n=5)	Negativo (n=103)	Positivo (n=54)	Negativo (n=54)
<b>Ratio SISH <i>MET/CEP7</i></b>								
Media (DE)	2.03 (1.40)	1.19 (0.28)	1.66 (0.98)	1.09 (0.17)	3.99 (1.56)	1.21 (0.26)	1.59 (0.92)	1.09 (0.17)
Mediana	1.60	1.15	1.44	1.09	4.23	1.15	1.39	1.09
Rango	0.91-5.93	0.62-2.67	0.62-5.93	0.76-1.60	2.17-5.93	0.62-1.85	0.62-5.93	0.76-1.77
<b>Número de copias <i>MET</i></b>								
Media (DE)	7.49 (3.58)	3.02 (0.72)	5.34 (2.93)	2.67 (0.48)	11.16 (5.54)	3.45 (1.34)	5.08 (2.78)	2.54 (0.35)
Mediana	6.10	2.92	4.42	2.64	12.60	3.05	4.11	2.57
Rango	5.10-17.50	1.80-4.75	2.75-17.50	1.80-4.45	4.40-17.50	1.80-9.86	3.10-17.50	1.80-3.05

<sup>1</sup> Criterio Cappuzzo (media del número de copias de *MET* por núcleo  $\geq 5$ ).

<sup>2</sup> Criterio UCCC (ratio *MET/CEP7*  $\geq 2$ , >15 copias de *MET* por núcleo en >10% de células tumorales, grupos de señales en >10% de células tumorales, elevada polisomía en  $\geq 40\%$  de células tumorales).

<sup>3</sup> Criterio ratio SISH *MET/CEP7*  $\geq 2$ .

<sup>4</sup> Criterio número de copias de *MET* por núcleo  $\geq 3.075$ .

DE: desviación estándar.

Al comparar la amplificación del gen *MET* con la presencia de alteraciones en los genes en los que se realizó el estudio mutacional, no se observó coexistencia entre las mismas. Ninguno de los ACs con mutaciones en el gen *EGFR* o en el gen *KRAS* mostró amplificación del gen *MET* en base al criterio del ratio SISH *MET/CEP7* (Tabla 23). En relación con las alteraciones

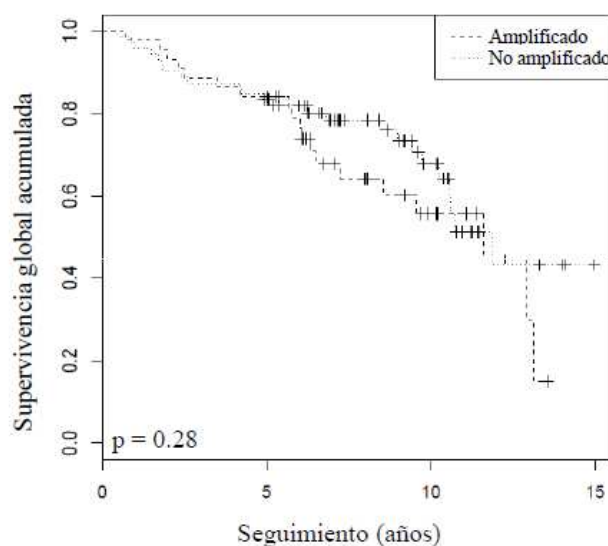
analizadas en el gen *PIK3CA*, ninguno de los SCCs que mostraron amplificación del gen *MET* presentó mutaciones en *PIK3CA* o amplificación de dicho gen.

**Tabla 23. Relación entre la presencia de amplificación del gen *MET* y mutaciones en los genes *EGFR* y *KRAS* en el grupo de ACs analizados**

	SISH <i>MET</i> Positivo (n=24)		SISH <i>MET</i> negativo (n=24)
	<i>MET</i> amplificado (n=3)	<i>MET</i> no amplificado (n=21)	
<i>EGFR</i>			
Wild-type (n=45)	3	19	23
Mutado (n=3)	0	2	1
<i>KRAS</i>			
Wild-type (n=41)	3	17	21
Mutado (n=7)	0	4	3

No se encontró asociación entre la amplificación de los genes *PIK3CA* o *MET* y características tales como el sexo, el hábito tabáquico o el grado de diferenciación de los tumores.

Por otro lado, el análisis de la supervivencia en relación con la presencia de amplificación en los genes analizados mostró que, al menos en el intervalo comprendido entre los cinco y los diez años de seguimiento, la amplificación del gen *PIK3CA* pareció asociarse con un peor pronóstico. No obstante, debido al tamaño muestral y considerando el tiempo total de seguimiento, esta observación no resultó estadísticamente significativa (Figura 17).



**Figura 17. Curva de supervivencia en función de la amplificación del gen *PIK3CA*.** La mediana de la supervivencia en los pacientes con amplificación del gen *PIK3CA* (n=44) fue de 11.6 años frente a los 11.9 años en pacientes sin amplificación del gen (n=72). La diferencia no fue estadísticamente significativa (p=0.28).

No se encontró que la amplificación del gen *MET* afectara positiva o negativamente a la supervivencia de los pacientes, con independencia del criterio utilizado en la valoración. Al comparar la supervivencia libre de progresión o la supervivencia global, la observación más destacada fue que los tumores que mostraban una verdadera amplificación del gen *MET*, en base al criterio ratio SISH *MET/CEP7*  $\geq 2$ , se caracterizaron por presentar una menor supervivencia global en comparación con los tumores no amplificados, si bien no se alcanzó el nivel de significación estadística (Tabla 24).

**Tabla 24. Análisis de la recidiva, supervivencia libre de progresión y supervivencia global en relación con la amplificación génica de los genes *PIK3CA* y *MET***

		FISH <i>PIK3CA</i>			SISH <i>MET</i> Ratio SISH <i>MET/CEP7</i> $\geq 2$			SISH <i>MET</i> Número de copias <i>MET</i> $\geq 3.075$		
		Amplificado (n=44) n (%)	No Amplificado (n=72) n (%)	p	Amplificado (n=5) n (%)	No Amplificado (n=103) n (%)	p	Positivo (n=54) n (%)	Negativo (n=54) n (%)	p
<b>Recidiva*</b>										
	Sí	10 (23.3)	19 (26.8)	0.677	2 (40)	44 (43.6)	1	27 (50.9)	19 (35.8)	0.117
	No	33 (76.7)	52 (73.2)		3 (60)	57 (56.4)		26 (49.1)	34 (64.2)	
<b>Supervivencia libre de progresión (meses)<sup>1</sup></b>										
	Media	27.09	35	0.891	28.38	27.53	0.706	26.94	28.45	0.336
	Mediana	20.25	19.75		28.38	16.17		15.20	19.49	
	DE	19.82	35.22		36.23	28.84		31.80	24.45	
	Rango	3.02-66.58	2.76-121.21		2.76-54.01	0.95-121.21		0.95-121.21	4.53-85.28	
<b>Supervivencia global (meses)<sup>2</sup></b>										
	Media	72.18	68.29	0.705	36.41	69.20	0.217	61.36	74.63	0.302
	Mediana	72.43	60.44		36.41	68.32		41.80	72.43	
	DE	44.12	46.58		43.82	48.44		48.14	48.74	
	Rango	8.81-157.68	5.43-142.62		5.42-67.4	6.12-201.14		5.42-154.88	11.1-201.14	

\* Característica desconocida para alguno de los tumores analizados.

<sup>1</sup> La supervivencia libre de progresión está calculada únicamente para los pacientes que experimentaron recidiva.

<sup>2</sup> La supervivencia global está calculada únicamente para los pacientes muertos (*PIK3CA*: 18 en el grupo amplificado, 24 en el grupo no amplificado; *MET* criterio ratio SISH *MET/CEP7*  $\geq 2$ : dos en el grupo amplificado, 64 en el grupo no amplificado; *MET* criterio ratio número de copias *MET*  $\geq 3.075$ : 33 en el grupo positivo, 33 en el grupo negativo).

DE: desviación estándar.

#### 4.2.2.3. Estudio de alteraciones en los niveles de expresión proteica

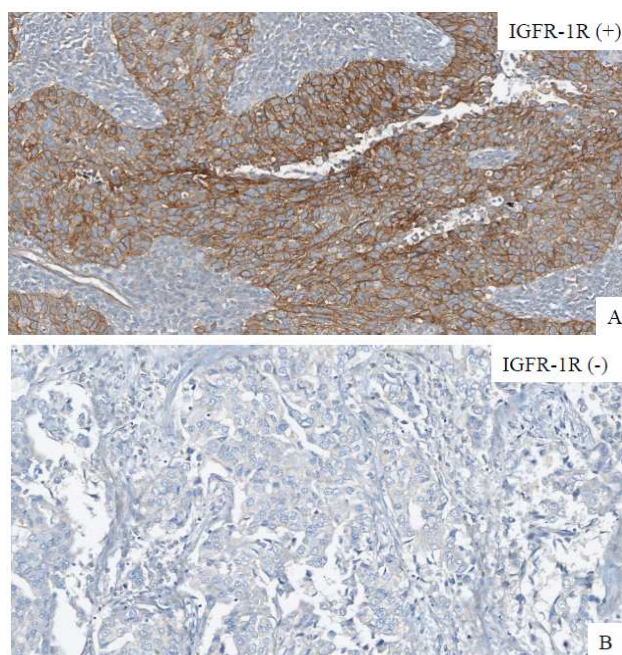
El análisis de la expresión proteica de IGF-1R mediante IHQ se realizó exclusivamente en los 123 SCCs de la serie con ADN disponible para la realización de estudios moleculares, obteniéndose resultados valorables en 117 de los tumores analizados (Tabla 25 y Figura 18). Tras la valoración, se encontró que el valor medio de la expresión de IGF-1R fue de 204 (rango = 0-400). En base al punto de corte establecido (expresión IGF-1R  $\geq 100$ ), 85 tumores (70%) se clasificaron como positivos y 35 (30%) como negativos.

**Tabla 25. Estudio de la expresión proteica de IGF-1R mediante inmunohistoquímica**

Expresión IGF-1R	SCC n=117*	
Positiva	82	70%
Negativa	35	30%

\* Seis tumores no pudieron ser analizados por IHQ.



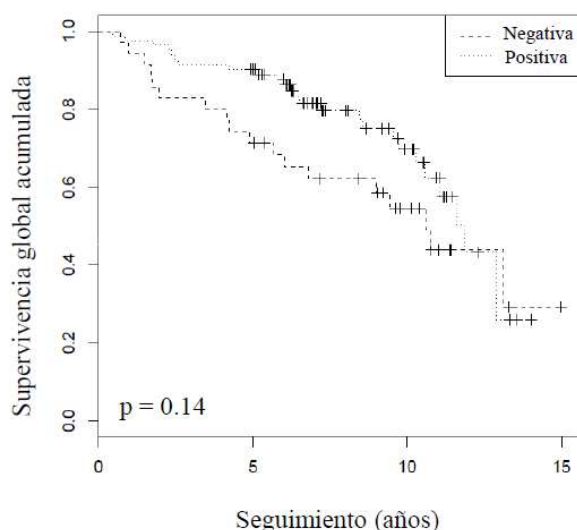


**Figura 18. Tinción inmunohistoquímica de IGF-1R.** Ejemplos representativos de un SCC positivo (A) y otro negativo (B) para IGF-1R (200x). Se consideró positividad para IGF-1R cuando el valor de la expresión resultaba  $\geq 100$ , valor que resulta de la multiplicación del porcentaje de células inmunorreactivas y de la intensidad de la tinción.

Al comparar la expresión de IGF-1R con otras de las alteraciones genéticas analizadas en el grupo de SCCs incluidos en esta serie, se encontró que la mayoría de los tumores con mutaciones en el gen *PIK3CA* (8/11, 73%) mostraban una expresión proteica considerada positiva para IGF-1R. Curiosamente, el 86% (6/7) de las mutaciones en el exón 9 del gen *PIK3CA* se detectaron en tumores con expresión de IGF-1R, mientras que el 14% (1/7) de las mutaciones en dicho exón se localizaron en tumores con ausencia de expresión de IGF-1R. Con respecto a las mutaciones en el exón 20 del gen *PIK3CA* no se encontró una relación similar, ya que la mitad se detectaron en tumores con expresión positiva de IGF-1R y la otra mitad en tumores considerados negativos. La relación entre las alteraciones en el gen *PIK3CA* y la expresión de IGF-1R también se observó a nivel de la amplificación génica. El 73% (32/44) de los tumores con amplificación del gen *PIK3CA* mostró una expresión proteica considerada positiva para IGF-1R. Por otro lado, no se observó que ninguno de los SCCs amplificados para *MET* en base al ratio *SISH MET/CEP7*  $\geq 2$  mostrara expresión proteica de IGF-1R.

De forma similar a lo observado para las alteraciones en el número de copias, no se encontró asociación entre la sobreexpresión de IGF-1R y características de los pacientes como el sexo o el hábito tabáquico, o con el grado de diferenciación de los tumores. Por su parte, el análisis de la supervivencia en relación con IGF-1R mostró que su expresión parece asociarse con un mejor pronóstico, si bien el tamaño muestral no permitió alcanzar la significación estadística

(Figura 19). Además, al comparar la supervivencia libre de progresión y la supervivencia global se encontró que ambas fueron marcadamente menores en los pacientes con SCCs que no mostraron expresión de IGF-1R, aunque nuevamente estas diferencias no alcanzaron la significación estadística (Tabla 26).



**Figura 19. Curva de supervivencia en función de la expresión de IGF-1R.** La mediana de la supervivencia en los pacientes con expresión de IGF-1R (n=82) fue de 11.9 años frente a los 10.6 años en pacientes con ausencia de expresión de la proteína (n=35). La diferencia no fue estadísticamente significativa (p=0.14).

**Tabla 26. Análisis de la recidiva, supervivencia libre de progresión y supervivencia global en relación con la expresión inmunohistoquímica de IGF-1R**

		IHQ IGF-1R		p
		Positiva (n=82) n (%)	Negativa (n=35) n (%)	
Recidiva*	Sí	16 (19.5)	12 (36.4)	0.057
	No	66 (80.5)	21 (63.6)	
Supervivencia libre de progresión (meses) <sup>1</sup>				0.109
	Media	38.31	25.53	
	Mediana	27.08	16.28	
	DE	30.19	31.94	
	Rango	2.76-110.6	3.02-121.21	
Supervivencia global (meses) <sup>2</sup>				0.181
	Media	81.23	64.68	
	Mediana	76.66	54.79	
	DE	46.56	46.01	
	Rango	5.43-154.92	8.81-157.68	

\* Característica desconocida para alguno de los tumores analizados.

<sup>1</sup> La supervivencia libre de progresión está calculada únicamente para los pacientes que experimentaron recidiva.

<sup>2</sup> La supervivencia global está calculada únicamente para los pacientes muertos (IGF-1R: 18 en el grupo con expresión positiva, 24 en el grupo con expresión negativa).

DE: desviación estándar.

## 4.2. APROXIMACIONES METODOLÓGICAS AL ESTUDIO DE MARCADORES PREDICTIVOS EN CÁNCER: ANÁLISIS DE MUTACIONES EN *EGFR* EN CÁNCER DE PULMÓN

### 4.3.1. Estudio de mutaciones en *EGFR* mediante secuenciación directa del producto de PCR

En la siguiente tabla (Tabla 27) se muestra la información relativa a la etapa pre-analítica de los dos métodos basados en PCR evaluados en el presente trabajo: secuenciación directa y PCR cuantitativa en tiempo real (kit *Therascreen EGFR Mutation Test*). Como puede verse, se realizó macrodissección en 22 (16%) de los 136 tumores analizados, siendo piezas quirúrgicas el 95% de estos tumores. Tras la extracción de ADN, se obtuvo una concentración mínima de 100ng/μl en el 65% de las muestras. El 92% de las muestras de las que se obtuvo una concentración inferior eran biopsias pequeñas (biopsias broncoscópicas y biopsias con aguja gruesa).

**Tabla 27. Resumen de las características de las muestras incluidas el estudio de mutaciones en el gen *EGFR* relativas a la etapa pre-analítica**

		Biopsias broncoscópicas (n= 43)		Biopsias con aguja gruesa (n= 7)		Piezas quirúrgicas (n= 86)	
Macrodissección		No 42 (98%)	Sí 1 (2%)	No 7 (100%)	Sí 0	No 65 (76%)	Sí 21 (24%)
% Tumor	Media	48	70	41		74	82
	Mediana	43	70	40		80	90
	Rango	10-95		10-70		15-95	25-95
[DNA] (ng/ul)	Media	68.2	96	34		732	832
	Mediana	35.1	96	21.9		593	545
	Rango	10-443		4.5-110.8		35.1-2261	69.2-3314

El análisis de mutaciones en *EGFR* por secuenciación directa del producto de PCR pudo realizarse en 133 de los 136 tumores incluidos en la serie. Tres muestras no pudieron ser valoradas (una biopsia broncoscópica y dos biopsias con aguja gruesa) debido a la baja calidad del ADN extraído (el ratio  $A_{260}/A_{230}$  fue, en cada caso, de 1.6, 0.2 y 0.7).

Se identificaron mutaciones en *EGFR* en 21 (16%) de los 133 tumores analizados (Tabla 28). Algunos ejemplos representativos de las mutaciones encontradas se muestran en la siguiente Figura 20. Las frecuencias de los diferentes tipos de mutaciones fueron las siguientes: 13 (62%) deleciones en el exón 19, nueve correspondientes a la deleción típica de 15 nucleótidos E746-

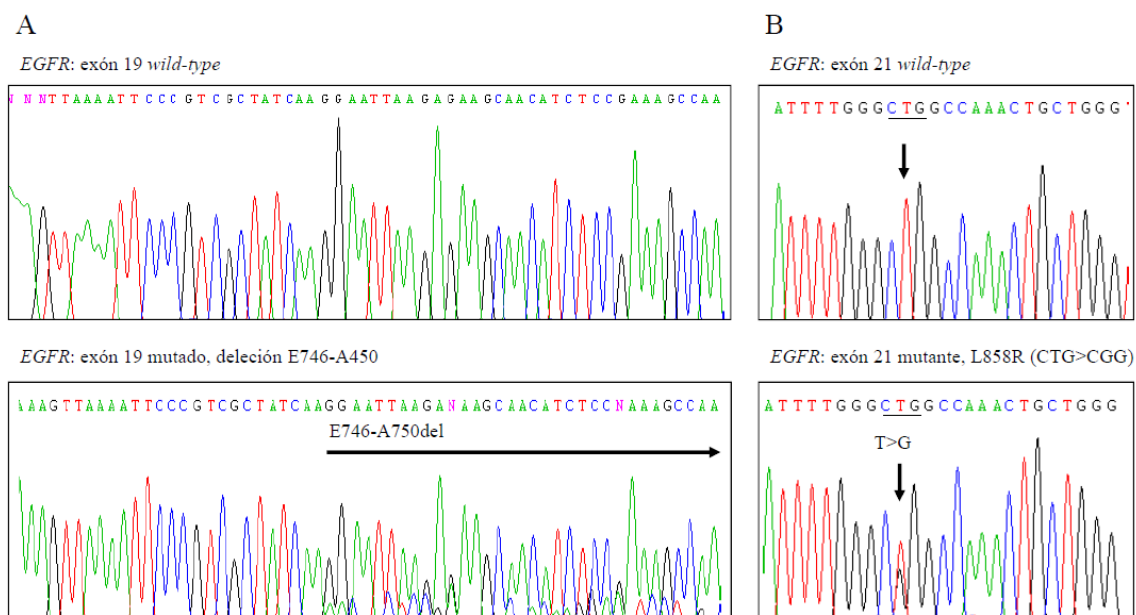
A750 y cuatro deleciones atípicas y/o complejas (dos L747-A750>P, una E746-S752>V y una L747-P753>S), cinco (24%) mutaciones puntuales L858R en el exón 21 y tres (14%) inserciones en el exón 20 (dos V769-D770insASV y una D770-N771insSVD). Es interesante destacar que la detección de mutaciones en *EGFR* fue similar tanto en piezas quirúrgicas (13/86, 15%) como en biopsias pequeñas (8/50, 16%).

**Tabla 28. Frecuencia de mutaciones en el gen *EGFR* detectadas por secuenciación directa y por PCR cuantitativa en tiempo real (*Therascreen EGFR Mutation Test kit*)**

<i>EGFR</i>	Secuenciación directa (n=136)	Therascreen <i>EGFR</i> Mutation Test (n=130*)
WT	112 (84%)	110 (86%)
MUT	21 (16%)	18 (14%)
Deleciones exón 19	13 (62%)	11 (61%)
E746-A750	9 (69%)	
atípicas y/o complejas	4 (31%)	
L858R	5 (24%)	5 (28%)
Inserciones exón 20	3 (14%)	2 (11%)
No valorable	3	2

WT: ausencia de mutaciones, MUT: mutado.

\* No se dispuso de ADN para estudios adicionales de seis de los tumores incluidos en el análisis de mutaciones por secuenciación directa (dos con deleciones en el exón 19 y cuatro *wild-types*).

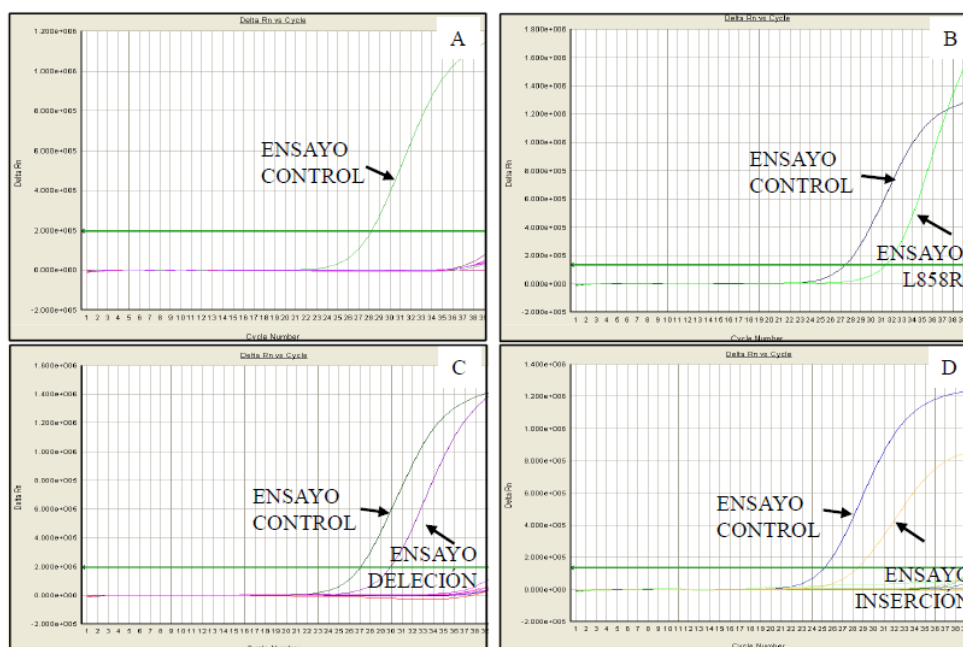


**Figura 20. Análisis de mutaciones en *EGFR* por secuenciación directa.** Deleción E746-A750 en el exón 19 (A), y mutación puntual L858R en el exón 21 (B). En ambos casos, en la parte superior se muestra el electroferograma correspondiente a la secuencia nativa o *wild-type* del exón y en la parte inferior se muestra el electroferograma correspondiente a la secuencia mutada. Obsérvese que la presencia de la mutación correspondiente se evidencia por la existencia de una doble secuencia y que en todos los casos el alelo *wild-type* predomina sobre el alelo mutado.

#### 4.3.2. Estudio de mutaciones en *EGFR* mediante PCR cuantitativa en tiempo real

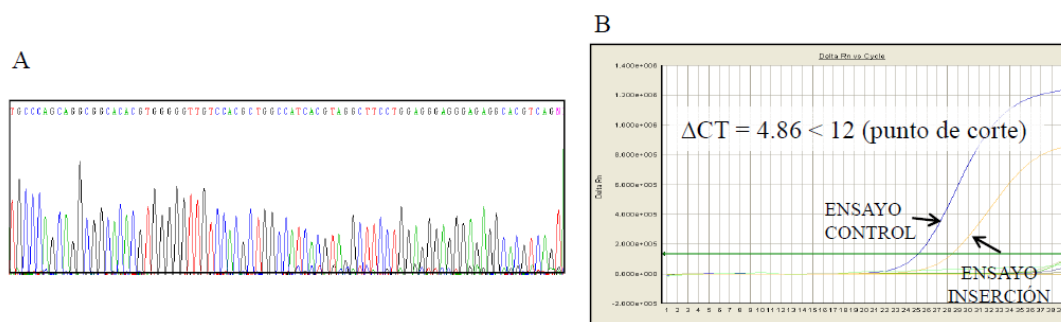
Para el análisis de mutaciones en *EGFR* por PCR cuantitativa en tiempo real no se dispuso de suficiente ADN de seis de los tumores previamente caracterizados por secuenciación directa (dos tumores mutantes, ambos con la delección E746-A750 en el exón 19, y cuatro sin mutación). El resultado del análisis obtenido por secuenciación directa se confirmó con el kit *Therascreen EGFR Mutation Test* en 126 de las muestras: 18 mutadas y 108 *wild-types* (Tabla 28). El kit identificó todas las delecciones en el exón 19 previamente caracterizadas por secuenciación directa, así como las mutaciones puntuales L858R en el exón 21. En cuanto a las inserciones en el exón 20, para una de las muestras se obtuvo un resultado discrepante al comparar ambos métodos: uno de los tumores en los que se había identificado una inserción en el exón 20 por secuenciación directa (D770-N771insSVD) dio un resultado negativo por el kit, debido a que no está diseñado para la detección de esta inserción. Por otro lado, este método permitió la caracterización de uno de los tres tumores que no pudieron ser analizados por secuenciación directa, no identificándose mutación alguna en el mismo. Curiosamente, dicha muestra era la que presentaba un ADN de mejor calidad de las tres ( $A_{260}/A_{280} = 1.6$ )

En la siguiente figura (Figura 21) se muestran ejemplos representativos de algunas de las mutaciones detectadas por el kit *Therascreen EGFR Mutation Test*.



**Figura 21.** Análisis de mutaciones en *EGFR* por el kit *Therascreen EGFR Mutation Test*. *EGFR* no mutado (A), mutación puntual L858R en el exón 21 (B), delección en el exón 19 (C), e inserción en el exón 20 (D). La mutación se evidencia por la presencia de amplificación en el ensayo de la mutación correspondiente además de la amplificación propia del ensayo control.

En relación con la etapa post-analítica, es importante destacar que en algunos casos la interpretación de la secuencia no fue clara debido a la baja intensidad de la secuencia mutada, mientras que la interpretación del resultado del kit fue inequívoca (Figura 22).



**Figura 22. Etapa post-analítica: interpretación de la secuenciación directa versus kit Therascreen EGFR Mutation Test.** El electroferograma (secuencia obtenida con el *primer reverse*) muestra la inserción V769-D770insASV en el exón 20 del gen *EGFR*: la baja intensidad de la señal correspondiente a la secuencia mutada puede hacer que se confunda con ruido de fondo (A). Curvas de amplificación correspondientes al mismo tumor analizado mediante PCR cuantitativa en tiempo real con el kit Therascreen EGFR Mutation Test: la diferencia de Ct entre el ensayo de la inserción y el ensayo control ( $\Delta Ct$ ) queda por debajo del punto de corte establecido para dicho ensayo, permitiendo la clasificación de la muestra como mutada (B).

#### 4.3.3. Estudio de mutaciones en *EGFR* mediante inmunohistoquímica

El estudio de mutaciones en *EGFR* mediante IHQ se realizó en 89 (65%) de los 136 tumores debido a que, tras la realización de los análisis moleculares previos, se agotó el tejido del resto de los tumores incluidos en la serie. De acuerdo con los resultados obtenidos por secuenciación directa del producto de PCR, estos 89 tumores incluían 19 tumores mutados: 11 con deleciones en el exón 19 (nueve correspondientes a la delección típica de 15 nucleótidos E746-A750 y dos complejas), cinco con la mutación puntual L858R en el exón 21 y tres con una inserción en el exón 20. Se contó además con el resultado del análisis con el kit Therascreen EGFR Mutation Test para 84 de estos tumores, incluyendo 16 de los 19 tumores con mutación en *EGFR* anteriormente indicados.

La comparación de los resultados del análisis de mutaciones en *EGFR* mediante IHQ con los obtenidos por secuenciación directa y por el kit Therascreen EGFR Mutation Test se detallan en la Tabla 29. Todos los tumores caracterizados como *wild-types* por secuenciación directa o PCR cuantitativa en tiempo real fueron negativos para la tinción con ambos anticuerpos. La expresión del anticuerpo dirigido contra la delección E746-A750 fue positiva en ocho de los nueve tumores en los que se identificó dicha alteración por secuenciación directa. Ninguno de los tumores caracterizados por presentar una delección compleja en el exón 19 distinta de la típica de quince nucleótidos E746-A750 mostró positividad para este anticuerpo. Dado que el kit Therascreen EGFR Mutation Test no permite la distinción entre los distintos tipos de deleciones en el exón 19, al comparar los resultados del análisis inmunohistoquímico de este anticuerpo con



los del método basado en PCR cuantitativa en tiempo real, se evidenció que el anticuerpo detectaba la presencia de la mutación en seis de los nueve tumores mutantes analizados. Con respecto a la mutación puntual L858R, de los cinco tumores mutados identificados mediante secuenciación directa o PCR cuantitativa, sólo dos mostraron positividad para el anticuerpo específico. Ninguno de los tumores con inserción en el exón 20 fue positivo para ninguno de los dos anticuerpos, confirmando la especificidad de los mismos por las alteraciones de los exones 19 y 21. Asimismo, no se observó reactividad cruzada de los anticuerpos, y ningún tumor mostró positividad para ambos.

**Tabla 29. Comparación de los resultados del análisis de mutaciones en el gen *EGFR* mediante inmunohistoquímica y secuenciación directa (A), o PCR cuantitativa en tiempo real (kit *Therascreen EGFR Mutation Test*) (B)**

A		Secuenciación directa					
		Deleción E746-A750	Otras deleciones exón 19	L858R	Inserciones exón 20	WT	Total
<b>IHQ deleción E746-A750</b>	Positivo	8	0	0	0	0	8
	Negativo	1	2	5	3	70	81
	Total	9	2	5	3	70	89
<b>IHQ L858R</b>	Positivo	0	0	2	0	0	2
	Negativo	8*	0*	3	2*	68*	81*
	Total	8*	0*	5	2*	68*	83*

B		Therascreen EGFR Mutation Test				
		Deleción exón 19	L858R	Inserciones exón 20	WT	Total
<b>IHQ deleción E746-A750</b>	Positivo	6	0	0	0	6
	Negativo	3	5	2	68	78
	Total	9	5	2	68	84
<b>IHQ L858R</b>	Positivo	0	2	0	0	2
	Negativo	8*	3	1*	68*	80*
	Total	8*	5	1*	68*	82*

WT: ausencia de mutaciones.

\* La tinción IHQ con el anticuerpo específico de la mutación L858R no fue valorable en el total de los tumores incluidos en el estudio de mutaciones en *EGFR* mediante técnicas basadas en PCR.

El resultado del análisis inmunohistoquímico de los tumores mutados y su comparación con los resultados obtenidos por los métodos basados en PCR anteriormente descritos, se detallan en Tabla 30. En todos los casos, la intensidad de la tinción fue moderada o intensa (2+ y 3+). Curiosamente, los tumores positivos para el anticuerpo dirigido contra la deleción en el exón 19 mostraron una tinción difusa, mientras que la tinción fue heterogénea en los tumores positivos para el anticuerpo específico de la mutación puntual L858R (Figura 23).

**Tabla 30. Análisis de mutaciones en *EGFR* mediante inmunohistoquímica, secuenciación directa y PCR cuantitativa en tiempo real (kit *Therascreen EGFR Mutation Test*)**

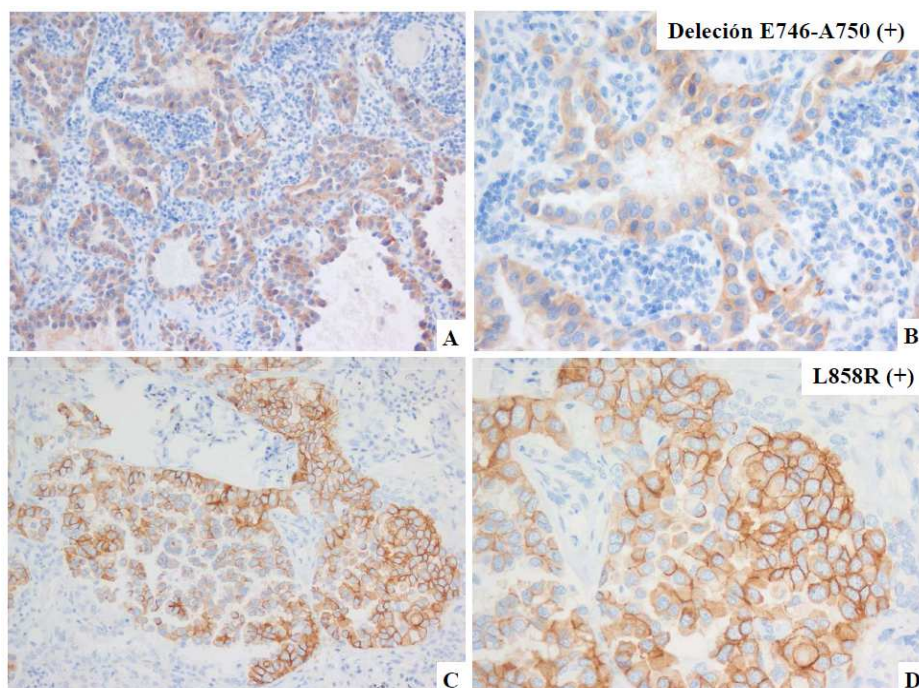
	Inmunohistoquímica						PCR	
	Anticuerpo específico deleción E746-A750			Anticuerpo específico L858R			Secuenciación directa	Therascreen EGFR Mutation Test
	Intensidad	%	Resultado	Intensidad	%	Resultado	Resultado	Resultado
Mutación exón 20	0	0	Negativo	NV	NV	NV	V769-D770insASV	Inserción
	0	0	Negativo	0	0	Negativo	V769-D770insASV	Inserción
	0	0	Negativo	0	0	Negativo	D770-N771insSVD	WT
Mutación exón 21	0	0	Negativo	0	0	Negativo	L858R	L858R
	0	0	Negativo	3+	90	Positivo	L858R	L858R
	0	0	Negativo	0	0	Negativo	L858R	L858R
	0	0	Negativo	3+	80	Positivo	L858R	L858R
	0	0	Negativo	0	0	Negativo	L858R	L858R
Mutación exón 19	3+	100	Positivo	NV	NV	NV	E746-A750del	NA
	3+	100	Positivo	NV	NV	NV	E746-A750del	NA
	2+	100	Positivo	NV	NV	NV	E746-A750del	Deleción
	2+	100	Positivo	0	0	Negativo	E746-A750del	Deleción
	2+	50	Positivo	0	0	Negativo	E746-A750del	Deleción
	2+	80	Positivo	0	0	Negativo	E746-A750del	Deleción
	2+	100	Positivo	0	0	Negativo	E746-A750del	Deleción
	2+	90	Positivo	0	0	Negativo	E746-A750del	Deleción
	0	0	Negativo	0	0	Negativo	E746-A750del	Deleción
	0	0	Negativo	0	0	Negativo	L747-A750>P	Deleción
	0	0	Negativo	0	0	Negativo	L747-P753>S	Deleción

Para los anticuerpos se indica la intensidad de la tinción, el porcentaje de células inmunorreactivas (%), así como el resultado de la valoración

WT: ausencia de mutaciones.

NA: tumor no analizado por el kit *Therascreen EGFR Mutation Test*.

NV: tinción inmunohistoquímica no valorable.

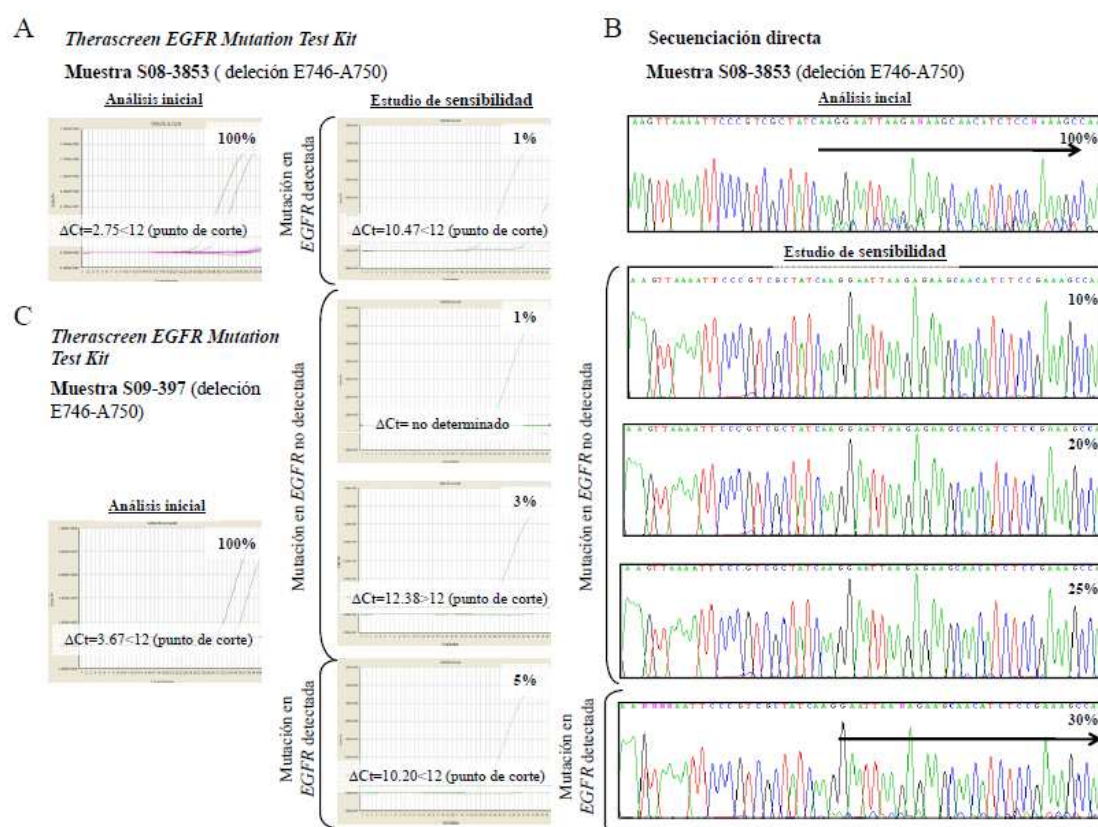


**Figura 23. Tinción inmunohistoquímica con anticuerpos específicos dirigidos contra formas mutadas de *EGFR* en NSCLCs.** Tumor con mutación en el exón 19 que muestra positividad para el anticuerpo dirigido contra la deleción E746-A750 (A: 200x; B: 400x), y tumor con mutación en el exón 21 que presenta positividad para el anticuerpo L858R (C: 200x; D: 400x).



#### 4.3.4. Estudio de sensibilidad

Una vez completado el análisis de mutaciones mediante los tres métodos, se procedió a comparar la sensibilidad de la secuenciación directa y del kit *Therascreen EGFR Mutation Test* mediante la realización de diluciones seriadas de ADN procedente de cada tumor mutado en ADN procedente de un tumor no mutado. El estudio se llevó a cabo en los 19 tumores mutantes para los que se dispuso de ADN. Los resultados se resumen en la Tabla 30 y varios ejemplos representativos se detallan en la Figura 24.



**Figura 24. Comparación de la sensibilidad de la secuenciación directa y del kit *Therascreen EGFR Mutation Test* para la detección de mutaciones en *EGFR*.** El estudio de sensibilidad se realizó a partir de diluciones seriadas de ADN procedente de un tumor mutado en ADN procedente de un tumor sin mutación. Se muestra el resultado del análisis inicial con cada método (100%), así como el resultado del estudio de sensibilidad, los porcentajes indican la proporción relativa de ADN mutado en relación al ADN no mutado. Para la muestra S08-3853, el kit detectó la presencia de la deleción en el exón 19 cuando el ADN mutado representaba el 1% del ADN total (A), mientras que la secuenciación directa no pudo detectar la mutación en esta muestra cuando el ADN mutado representaba menos del 30% del ADN total (B). Para la detección de la mutación presente en la muestra S09-397 por el kit se requirió que la proporción relativa de ADN mutado fuera del 5% (C). El punto de corte establecido por el kit para definir la presencia de la mutación correspondiente deriva de análisis realizados con líneas celulares y construcciones sintéticas.

El kit *Therascreen EGFR Mutation Test* detectó la presencia de mutaciones en *EGFR* en la mitad de los tumores cuando el porcentaje de ADN mutante con respecto al ADN no mutado presentaba el 1% (Tabla 31A, Figura 24A). Ninguno de estos tumores se caracterizó por presentar

un infiltrado inflamatorio linfocitario relevante y, curiosamente, todos presentaban un porcentaje de celularidad tumoral  $\geq 40\%$  (mediana = 59%, media = 60%, rango = 40-85%). Este método identificó la presencia de mutaciones cuando el ADN mutante representaba un 5% del ADN total analizado en todos los tumores estudiados (Tabla 31A, Figura 24C). Es interesante destacar que, de los tres tumores en los que se requirió una proporción de ADN mutado del 5% para la detección de la mutación, uno presentaba un porcentaje de celularidad tumoral relativamente bajo (30%), que no pudo enriquecerse por macrodissección al tratarse de una biopsia broncoscópica.

**Tabla 31. Sensibilidad de la detección de mutaciones en *EGFR*: comparación de la secuenciación directa versus PCR cuantitativa en tiempo real (kit *Therascreen EGFR Mutation Test*)**

A

Porcentaje relativo de ADN mutado	Kit <i>Therascreen EGFR Mutation Test</i> (n=18) <sup>a, b</sup>	Porcentaje relativo de ADN mutado	Secuenciación directa (n=19) <sup>a, b</sup>
1%	9/18 (50%)	10%	1/19 (5%)
3%	15/18 (83%)	20%	6/19 (31%)
5%	18/18 (100%)	25%	6/19 (31%)
		30%	12/19 (63%)
		N.D.	7/19 (37%)

B

Kit <i>Therascreen EGFR Mutation Test</i> (n=18) <sup>a, b</sup>			
Porcentaje relativo de ADN mutado	Deleción exón 19 (n=11)	L858R (n=5)	Inserción exón 20 (n=2)
1%	8/11 (73%)	0/5	1/2 (50%)
3%	10/11 (91%)	4/5 (80%)	1/2 (50%)
5%	11/11 (100%)	5/5 (100%)	2/2 (100%)

C

Secuenciación directa (n=19) <sup>a, b</sup>			
Porcentaje relativo de ADN mutado	Deleción exón 19 (n=11)	L858R (n=5)	Inserción exón 20 (n=3)
10%	0/11	1/5 (20%)	0/3
20%	3/11 (27%)	1/5 (20%)	2/3 (67%)
25%	3/11 (27%)	1/5 (20%)	2/3 (67%)
30%	7/11 (64%)	2/5 (40%)	3/3 (100%)
N.D.	4/11 (36%)	3/5 (60%)	0

ND: no determinado.

<sup>a</sup>No se dispuso de cantidad suficiente de ADN de dos de los tumores mutados (deleción E746-A750) incluidos en la serie para la realización del estudio de sensibilidad.

<sup>b</sup>El kit caracterizó como *wild-type* un tumor en el que la secuenciación directa identificó la inserción en el exón 20 D770-N771insSVD al no estar diseñado para detectar esta mutación.

La secuenciación directa del producto de PCR sólo fue capaz de detectar la presencia de mutaciones en *EGFR* cuando el ADN mutante representaba el 10% del ADN total en uno de los tumores analizados (Tabla 31A). Esta muestra correspondía a una pieza quirúrgica y tenía el mayor porcentaje de celularidad tumoral de la serie (95%). Se necesitó que el porcentaje de ADN mutante con respecto al ADN no mutado fuera de al menos un 30% para que la secuenciación directa pudiera detectar la mutación en la mayoría de los casos (12/19, 63%) (Tabla 31A, Figura 24B). Sin embargo, es importante destacar que este método no fue capaz de detectar la presencia de mutaciones en siete de los tumores mutantes. Curiosamente, uno de estos tumores se

caracterizó por presentar el mayor grado de inflamación linfocitaria de la serie (75-80%) y otro correspondía al tumor con el que se obtuvo un resultado pobre en el estudio de sensibilidad con el kit (5%) debido al bajo porcentaje de celularidad tumoral (30%) que presentaba (Tabla 31A).

Al considerar el estudio de sensibilidad en función de los distintos tipos de mutaciones características de *EGFR*, es importante destacar que para detectar la mutación puntual L858R se necesitó una mayor proporción de ADN mutado en relación con el ADN no mutado con ambos métodos. Ninguna de las mutaciones L858R se detectó a una dilución del 1% con el kit *Therascreen EGFR Mutation Test*, mientras que más del 70% de las deleciones en el exón 19 caracterizadas se detectaron cuando el ADN mutado representaba sólo el 1% (Tabla 31B). En cuanto a la secuenciación directa, destaca que más del 60% de las deleciones se detectaron cuando la proporción relativa de ADN mutante respecto al ADN no mutado era del 30%, mientras que esto sólo ocurrió con el 40% de las mutaciones L858R. En consecuencia, no pudo establecerse el límite de sensibilidad por secuenciación directa para el 60% de los tumores que presentaban la mutación puntual L858R, mientras que el estudio de sensibilidad de las deleciones en el exón 19 no fue concluyente sólo en el 36% de tumores (Tabla 31C).

En relación con el estudio inmunohistoquímico, la sensibilidad y especificidad de los dos anticuerpos utilizados, así como su valor predictivo positivo (VPP) y negativo (VPN) se detallan en la Tabla 32. La especificidad de los dos anticuerpos pudo considerarse del 100%, tanto si se comparaban los resultados de la tinción con los obtenidos por secuenciación directa como por PCR cuantitativa en tiempo real (kit *Therascreen EGFR Mutation Test*). En cuanto a la sensibilidad, destaca que el anticuerpo dirigido contra la deleción E746-A750 presentó una sensibilidad próxima al 90% cuando se comparaba con los resultados obtenidos por secuenciación directa. No obstante, esta sensibilidad disminuyó aproximadamente al 73% si se consideraba el total de las deleciones detectadas por secuenciación directa. De forma similar, al comparar con los resultados obtenidos con el kit, que no permite discriminar entre los distintos tipos de deleciones identificadas en *EGFR*, la sensibilidad del anticuerpo específico de la deleción E746-A750 fue igualmente baja. Por otra parte, la sensibilidad del anticuerpo dirigido contra la mutación puntual L858R sólo alcanzó el 40%, tanto si se comparaba el resultado de la tinción con los de la secuenciación o con los del kit. Considerando globalmente ambos anticuerpos y los resultados de la secuenciación, la sensibilidad y la especificidad para la detección de las mutaciones dianas se situó en el 71.4% y el 100%, respectivamente. Si bien, la sensibilidad disminuiría hasta casi el 50% si se tuvieran en cuenta las otras mutaciones identificadas en *EGFR*, incluidas las deleciones complejas en el exón 19 y las inserciones en el exón 20, tanto si se comparaban los resultados del estudio inmunohistoquímico con los de la secuenciación directa como con los del kit *Therascreen EGFR Mutation Test*.

**Tabla 32. Características analíticas de los anticuerpos empleados en el estudio de mutaciones en *EGFR* mediante inmunohistoquímica en función de los resultados de secuenciación directa y de PCR cuantitativa en tiempo real (kit *Therascreen EGFR Mutation Test*)**

		Secuenciación directa			
Anticuerpo	Alteración genética	Sensibilidad (%)	Especificidad (%)	VPP (%)	VPN (%)
E746-A750	Deleción E746-A750	88.9	100	100	98.8
E746-A750	Deleciones exón 19	72.7	100	100	96.3
L858R	L858R	40	100	100	96.3
E746-A750+L858R	Deleción E746-A750 + L858R	71.4	100	100	94.6
E746-A750+L858R	Deleciones exón 19 + L858R + inserciones exón 20	52.6	100	100	88.6

		kit <i>Therascreen EGFR Mutation Test</i>			
Anticuerpo	Alteración genética	Sensibilidad (%)	Especificidad (%)	VPP (%)	VPN (%)
E746-A750	Deleciones exón 19	66.7	100	100	96.2
L858R	L858R	40	100	100	96.4
E746-A750+L858R	Deleciones exón 19 + L858R	57.1	100	100	92.1
E746-A750+L858R	Deleciones exón 19 + L858R + inserciones exón 20	50	100	100	84.5

VPP: valor predictivo positivo.

VPN: valor predictivo negativo.

## **5. DISCUSIÓN**



## 5.1. ANÁLISIS DE PERFILES DE EXPRESIÓN GÉNICA EN CARCINOMAS DE PULMÓN NO MICROCÍTICOS

### 5.1.1. Identificación de firmas genéticas asociadas con la histología de los carcinomas de pulmón no microcíticos

El análisis de los perfiles de expresión génica se ha convertido en una herramienta valiosa para la investigación en cáncer al permitir una mayor precisión en la caracterización y clasificación de los distintos tipos tumorales (Meyerson et al., 2005). En concordancia con observaciones previas (Borczuk et al., 2003; Kikuchi et al., 2003; Parmigiani et al., 2004; Nakamura et al., 2006; Takeuchi et al., 2006), nuestro análisis no supervisado agrupó los NSCLCs según su histología, separando de forma clara ACs de SCCs, y evidenciando la existencia de una firma genética característica de cada tipo histológico. Este consenso entre diferentes estudios, incluso cuando el análisis se realiza con plataformas distintas, subraya lo diferente que son ambas histologías. La confirmación de que ACs y SCCs son entidades bien definidas no sorprende si se tiene en cuenta que cada tipo de carcinoma de pulmón procede de células de distinto origen embrionario, surge en distintas localizaciones y presenta alteraciones genéticas específicas (Travis et al., 2004).

La identificación de nuevos marcadores que permitan una discriminación más precisa entre ACs y SCCs, especialmente cuando sólo se dispone de biopsias pequeñas para su diagnóstico, tiene cada vez mayor importancia ya que, como se ha indicado anteriormente, muchos de los agentes terapéuticos que se emplean actualmente para el tratamiento del cáncer de pulmón muestran una acción preferente en un tipo histológico concreto (Langer et al., 2010). El análisis supervisado aquí presentado evidenció que los SCCs muestran altos niveles de expresión de un mayor número de genes que los ACs, incluyendo algunos que codifican proteínas, como las queratinas, que ya se utilizan en los departamentos de Anatomía Patológica como marcadores para el diagnóstico diferencial de los carcinomas de pulmón. También se confirmaron observaciones previas que mostraban un mayor nivel de expresión de los genes *SPRR*, *GPX2*, *CSTA*, *FABP5* y *P63* en SCCs en comparación con ACs y pulmón normal (Nacht et al., 2001; Wigle et al., 2002; Borczuk et al., 2003; Parmigiani et al., 2004). De entre los genes que constituyeron la firma genética de los SCCs destacaron, por su elevada expresión relativa, *DSC3* (desmocollina 3) y *PKP1* (plakofilina), que codifican componentes de los desmosomas, una de las estructuras características de diferenciación epidermoide. Los niveles de expresión de ambos genes en SCCs fueron 20 veces superiores a los presentados por ACs y pulmón normal por lo que podrían incorporarse al catálogo de marcadores disponibles para un diagnóstico diferencial más preciso. De hecho, la utilidad de *DSC3* como marcador de diferenciación epidermoide en

carcinomas de pulmón fue validada, a la luz de nuestros resultados, por un grupo de investigadores independiente (Monica et al, 2009).

### **5.1.2. Identificación de firmas genéticas asociadas con alteraciones en genes relevantes en carcinomas de pulmón no microcíticos**

Otro hallazgo significativo del presente análisis no supervisado fue que los ACs portadores de mutaciones en el gen *EGFR* constituyeron un grupo diferenciado, lo que supone una nueva evidencia de que los ACs con estas mutaciones representan una entidad bien definida y diferenciada con respecto a otros ACs de pulmón. De hecho, desde el descubrimiento de las mutaciones en el gen *EGFR* y su relación con la respuesta a ITKs dirigidos contra EGFR en cáncer de pulmón, estos tumores han sido considerados un grupo bien definido dentro de los ACs, con una etiología y unas características clínico-patológicas que los diferencian de los ACs con *EGFR wild-type* (Yatabe et al., 2005; Conde et al., 2006; Takeuchi et al., 2006). Otros estudios de expresión génica han definido subtipos dentro de los ACs de pulmón que son consistentes con los hallazgos aquí presentados, como el “bronquiode”, que incluye a la mayoría de los ACs con características histológicas bronquioloalveolares y mutaciones en *EGFR* (Hayes et al., 2006). En línea con las observaciones derivadas del análisis no supervisado, la existencia de una firma genética característica de los ACs con mutaciones en *EGFR* se evidenció de forma clara en el análisis supervisado, destacando la marcada sobreexpresión de *PRODH*. El enzima codificado por este gen media la apoptosis inducida por p53 en cáncer de pulmón y participa en la regulación de la vía KRAS/MEK/ERK (Liu et al., 2006), lo que indica que la presencia de mutaciones en *EGFR* desregula los procesos celulares de transducción de señales y apoptosis. Otros autores, tras analizar los perfiles de expresión génica de tumores de pulmón de pacientes de origen asiático, encontraron una firma genética característica de los ACs con mutaciones en *EGFR* diferente a la aquí presentada (Takeuchi et al., 2006). El hecho de que, por razones que aún no se conocen bien, los tumores de pulmón de individuos asiáticos presentan una mayor frecuencia de mutaciones en el gen *EGFR*, y el uso de distintas plataformas de *microarrays*, podrían explicar la falta de concordancia entre resultados. Además, es importante señalar que los genes identificados en el citado estudio no están incluidos en el CNIO OncoChip v.2, plataforma de *microarrays* utilizada en el presente trabajo. Por otro lado, la existencia de una firma genética característica de tumores portadores de alteraciones en otros genes relevantes para la carcinogénesis pulmonar, como *TP53* o *KRAS*, no resultó tan evidente. Otros autores tampoco han identificado un patrón de expresión común en ACs con mutaciones en *KRAS* (Beer et al., 2002; Sweet-Cordero et al., 2005; Takeuchi et al., 2006). La existencia de alteraciones en genes funcionalmente equivalentes podría explicar la ausencia de una firma genética asociada a mutaciones en *TP53* o *KRAS*. Además hay que considerar las limitaciones técnicas que pueden impedir la correcta identificación de mutaciones



para poder estudiar luego diferencias en la expresión génica entre tumores portadores o no de mutaciones. Por un lado, la detección de mutaciones en tumores primarios puede verse afectada por la contaminación por células normales. Por otro lado, la existencia de mutaciones en regiones distintas de las caracterizadas como *hot spots* (el análisis mutacional realizado en el presente estudio se centró únicamente en estas regiones), podría conducir a resultados falsos negativos si el análisis no incluye todo el gen. En cualquier caso, la identificación de una firma genética asociada con la presencia de mutaciones en *EGFR* o en otros genes podría contribuir a mejorar los modelos predictivos, basados en firmas genéticas, especialmente tras la exposición a un agente terapéutico.

El análisis global de la expresión génica también permitió la identificación de un grupo de genes sobreexpresados en la región 3q26, que incluía a *PIK3CA*. Se han descrito alteraciones en el gen *PIK3CA* en distintos tipos tumorales, como cáncer de colon, mama o sistema nervioso, y su papel como oncogén es reconocido (Shayesteh et al., 1999; Campbell et al., 2004; Samuels et al., 2004; Levine et al., 2005; García-Rostán et al., 2005). En cáncer de pulmón, las mutaciones activadoras de *PIK3CA* son poco frecuentes, mientras que la amplificación de la región cromosómica 3q22-q26 es una de las alteraciones más comunes, especialmente en SCCs (Massion et al., 2002; Samuels et al., 2004; Kawano et al., 2006; Kawano et al., 2007; Okudela et al., 2007; Yamamoto et al., 2008). Nuestros resultados confirmaron que el incremento en la expresión de *PIK3CA* observado se debe a su amplificación génica, y que esta alteración ocurre preferentemente en SCCs, lo que apoyaría la naturaleza oncogénica de esta alteración. Otros autores han señalado otras posibles dianas del amplicón de la región 3q26, como el oncogén *EVII*, sugiriendo un importante papel en la carcinogénesis pulmonar (Yokoi et al., 2003; Kim et al., 2005). Sin embargo, al comparar nuestros resultados del análisis de FISH con los datos de expresión de los genes presentes en esa región, *PIK3CA* mostró la correlación más estrecha entre la amplificación y sobreexpresión génica, lo que apoya su papel como diana del amplicón.

Considerando globalmente los resultados del análisis de la expresión génica, es interesante destacar la utilidad de la información derivada de estos estudios ya que contribuye a un mejor conocimiento de las alteraciones moleculares subyacentes al desarrollo de los tumores, permitiendo además identificar nuevos subtipos y predecir su evolución clínica. No obstante, estos análisis deben interpretarse con cautela, ya que la desproporción entre el número de muestras analizadas y el número de genes evaluados puede hacer que se consideren como relevantes firmas genéticas o marcadores diferencialmente expresados por azar (Simon et al., 2003). En este año, se han encontrado ejemplos de interpretaciones erróneas derivadas de estudios de *microarrays* que han obligado publicar retracciones de trabajos previos (Bonnetfoi et al., 2011; Potti et al., 2011a; Potti et al., 2011b; Hsu et al., 2011). Se evidencia así la necesidad de validar, en series independientes y con diferentes metodologías, los resultados obtenidos antes de incorporar esas firmas genéticas al catálogo de alteraciones moleculares características de un tumor y poder emplearlas con fines diagnósticos, pronósticos y terapéuticos. Como se ha indicado

anteriormente, los marcadores asociados con la histología identificados en nuestro estudio incluyen algunos previamente caracterizados y otros nuevos que han sido validados posteriormente por grupos independientes. Además, como parte de un proceso de validación interna, dos de las observaciones más relevantes de nuestro estudio de *microarrays*, la sobreexpresión de P63 y la amplificación de *PIK3CA*, se analizaron en profundidad como parte del estudio de dianas terapéuticas y marcadores predictivos en NSCLCs. Por su parte, la posible firma genética asociada con la presencia de mutaciones en *EGFR* tendría que ser asimismo validada.

## 5.2. ESTUDIO DE DIANAS TERAPÉUTICAS Y MARCADORES PREDICTIVOS EN CARCINOMAS DE PULMÓN NO MICROCÍTICOS

### 5.2.1. Valor de la expresión proteica de P63 en la clasificación histológica de los carcinomas de pulmón no microcíticos

En la actualidad, en el contexto de las terapias dirigidas, para el tratamiento personalizado del cáncer de pulmón es necesario establecer, en primer lugar, un diagnóstico preciso del tumor. Como se ha indicado anteriormente, existe una necesidad real de discriminar de forma precisa entre SCCs y no-SCCs. En el estudio de *microarrays* descrito se identificó una firma genética característica de los SCCs, en la que destacaba la marcada expresión de *DSC3* o *PKP1*. Diversos estudios, basados en el análisis de la expresión génica o proteica, han demostrado que la sobreexpresión del gen *P63*, uno de los marcadores de diferenciación epidermoide más reconocido y que también se incluía en la firma genética identificada en nuestro estudio, es característica de los SCCs de pulmón (Bhattacharjee et al., 2001; Garber et al., 2001; Borczuk et al., 2003; Amatschek et al., 2004; Au et al., 2004a; Ullmann et al., 2004; Hou et al., 2010). Aunque la diferencia de expresión de *P63* entre ACs y SCCs no alcanzó los niveles observados de *DSC3* o *PKP1*, se eligió como marcador a la hora validar en una serie clínica los resultados previos y confirmar su utilidad para identificar de forma precisa los SCCs de pulmón, ya que su tinción nuclear es reproducible y el anticuerpo está disponible en los departamentos de Anatomía Patológica puesto que se utiliza de forma rutinaria para diferenciar, entre otros, los carcinomas *in situ* de los infiltrantes en cáncer de mama y de próstata (Kaufmann et al., 2001; Werling et al., 2003; Shah et al., 2004).

Los resultados aquí presentados ponen de manifiesto la utilidad de la expresión proteica de P63 estudiada mediante IHQ a la hora de reducir la categoría de LCCs diagnosticados en piezas quirúrgicas. La mitad de los carcinomas clasificados inicialmente como LCCs pudieron reclasificarse como SCCs en base a la expresión de P63. A la hora de trasladar a la clínica estas observaciones, se hizo especial hincapié en la especificidad de la tinción IHQ y se modificó en

consecuencia el punto de corte para considerar su positividad con respecto al criterio de valoración seguido en el estudio de *microarrays*. Aunque en la literatura se ha descrito que cierto porcentaje de ACs puede expresar P63, es un hecho que la negatividad para este marcador se considera característica de ACs (Pelosi et al., 2002; Au et al., 2004b; Massion et al., 2003; Sheikh et al., 2004; Kargi et al., 2007; Rodig et al., 2009; Lebanony et al., 2009). La positividad mostrada por algunos ACs puede explicarse por la variabilidad inherente al proceso de IHQ, que se deriva de la selección de anticuerpos utilizados y de los diferentes criterios de valoración. De acuerdo con otros autores (Wu et al., 2003), en el presente trabajo cualquier tinción débil o focal de P63 se consideró como no específica y se restringió la positividad a los casos que presentaron una tinción intensa en más del 50% de células tumorales. El uso de esta valoración hizo que menos ACs sean positivos para P63, tal y como han demostrado otros estudios (Ang et al., 2010). Estos autores demuestran que los ACs raramente (1.6%) muestran una tinción difusa (>50% de células tumorales) para P63, pudiendo presentar, no obstante, tinción focal ( $\leq 20\%$  de células tumorales). En nuestro estudio, la especificidad resultó aún mayor ya que ninguno de los LCCs reclasificados como ACs expresaba P63.

Se han propuesto otros abordajes para mejorar la clasificación de los carcinomas de pulmón: el empleo de una combinación de marcadores de uso común en los departamento de Anatomía Patológica, como CD63, P63, CD56, TTF-1, CK 5/6, TRIM29, CEACAM5, SLC7A5 y MUC1, entre otros (Kargi et al., 2007; Ring et al., 2009; Pardo et al., 2009; Kim et al., 2010; Terry et al., 2010; Nicholson et al., 2010; Loo et al., 2010); la utilización de nuevos marcadores asociados con diferenciación epidermoide o glandular, como DSC3 (Angulo et al., 2008; Monica et al., 2009) o NTRK1 y 2 (Terry et al., 2010); e incluso la expresión de micro-ARNs (Lebanony et al., 2009). El uso de un número elevado de marcadores puede suponer una mayor especificidad pero también dificulta su aplicación en la clínica debido a lo limitado del material disponible para el diagnóstico en cáncer de pulmón, especialmente cuando se trata de biopsias broncoscópicas o con aguja gruesa. Frente a estos abordajes, el presente trabajo propone el uso de sólo dos anticuerpos (P63 y TTF1) para un diagnóstico diferencial entre ACs y SCCs. Curiosamente, otro grupo ha llegado a conclusiones similares aunque los resultados concretos no han sido facilitados (Rossi et al., 2009). En el contexto de las terapias dirigidas, la aplicación de esta aproximación en la práctica clínica sería realista. El llegar a un diagnóstico empleando el menor número posible de marcadores permitiría garantizar la mayor disponibilidad de material para la caracterización molecular del tumor, y se podría priorizar así el estudio de aquellas alteraciones genéticas más relevantes asociadas con la respuesta a fármacos en ese tipo histológico concreto (Langer et al., 2010; Travis et al., 2010). Este abordaje podría aplicarse además en todos aquellos contextos en los que, al valorarse una eventual terapia que esté o no indicada para un tipo histológico concreto, no pueda aceptarse un diagnóstico no específico de carcinoma de pulmón. La IHQ de P63, siguiendo un criterio estricto de interpretación, mejora la identificación de SCCs, por lo que puede

aplicarse no sólo a las piezas quirúrgicas diagnosticadas de LCC, sino también a las biopsias pequeñas con un diagnóstico de carcinoma NOS (Conde et al., 2010; Terry et al., 2010; Nicholson et al., 2010; Loo et al., 2010). Así, al contribuir a un diagnóstico histológico preciso y reproducible, optimizaría significativamente el uso de terapias dirigidas.

### **5.2.2. Estudio de dianas terapéuticas y marcadores predictivos en carcinomas de pulmón no microcíticos**

El establecimiento de un diagnóstico histológico preciso representa una primera etapa y, en ningún caso, la histología ha de considerarse un marcador predictivo concluyente. Tras establecer el diagnóstico será necesario analizar los marcadores moleculares oportunos, tal y como se ha realizado en el presente trabajo, para seleccionar la terapia más adecuada.

#### **5.2.2.1. EGFR**

La identificación de las mutaciones somáticas en el gen *EGFR* en NSCLCs y su valor predictivo de respuesta a ITKs dirigidos contra EGFR ha supuesto el avance terapéutico más importante en cáncer de pulmón de las últimas décadas (Lynch et al., 2004; Pao et al., 2004; Paez et al., 2004). EGFR es uno de los miembros de la familia de receptores con actividad tirosina quinasa conocidos globalmente como ErbB, y participa en el control de la proliferación y la supervivencia celular a través de la activación de las vías KRAS/MEK/ERK y PI3K/AKT/mTOR. En NSCLCs, y en otros tipos tumorales, se han descrito tres mecanismos moleculares responsables de la desregulación de su función y que inducen la carcinogénesis: mutaciones, amplificación génica y sobreexpresión de la proteína (Holbro et al., 2003). Estas tres alteraciones se han contemplado como posibles marcadores de respuesta a los ITKs. A pesar de que el debate sobre los criterios de selección de pacientes para el tratamiento con ITKs dirigidos contra EGFR ha sido intenso (Johnson & Jänne, 2005), y que algunos estudios parecen demostrar cierto solapamiento entre los tres tipos de alteraciones (Coate et al., 2009), los resultados que apoyarían un valor predictivo de la amplificación o de la sobreexpresión de EGFR no son concluyentes (Tsao et al., 2005; Cappuzzo et al., 2005; Hirsch et al., 2006), mientras que las mutaciones son las que mejor se asocian con la respuesta a ITKs y se consideran, por tanto, el marcador predictivo por excelencia (Mitsudomi et al., 2005; Sequist et al., 2008; Mok et al., 2009; Rosell et al., 2009, Rosell et al., 2011). La importancia de este hallazgo ha hecho que sea necesario determinar la frecuencia de esta alteración y caracterizar adecuadamente su contexto clínico, anatomopatológico y molecular. El análisis de mutaciones en el gen *EGFR* en la serie de NSCLCs sobre la que se ha realizado el presente estudio de dianas terapéuticas y marcadores predictivos reveló una frecuencia ligeramente inferior (~6%) a la descrita en la literatura para pacientes de

origen caucásico (~15%). Esta diferencia podría justificarse en el hecho de que se trata de una serie de tumores en estadios iniciales, mientras que los estudios retrospectivos y prospectivos que se han realizado hasta el momento corresponden en su mayoría a tumores en estadios avanzados (Shepherd et al., 2005; Thatcher et al., 2005; Mok et al., 2009; Rosell et al., 2009; Mitsudomi et al., 2010; Rosell et al., 2011). Nuestros resultados no mostraron ningún significado pronóstico de la presencia de estas mutaciones, posiblemente debido al limitado número de tumores analizados y de mutaciones encontradas. El valor pronóstico y predictivo de las mutaciones en *EGFR* en estadios iniciales aún no está definido (Mok, 2011), aunque todo apunta a una confirmación de lo observado en NSCLCs avanzado (Kosaka et al., 2009).

Por otro lado, y de acuerdo con resultados previos (Kosaka et al., 2004; Shigematsu et al., 2005; Conde et al., 2006; Onitsuka et al., 2010), ninguno de los tumores analizados presentó simultáneamente mutaciones en los genes *EGFR*, *KRAS* y *BRAF*, confirmándose la naturaleza mutuamente excluyente de estas alteraciones. Este hecho apoyaría la hipótesis ampliamente aceptada de que solamente es necesario que un componente de una vía de señalización esté alterado para que tenga lugar la transformación celular y se produzca su expansión clonal.

Tal y como se indicaba anteriormente, diferentes estudios realizados han evidenciado que las mutaciones en *EGFR* son más comunes en ciertos grupos de pacientes: mujeres, no fumadores y con tumores con un patrón de crecimiento específico (bronquioloalveolar o papilar, según la última clasificación de la OMS, Travis et al., 2004) (Yatabe et al., 2005; Conde et al., 2006; Takeuchi et al., 2006). Nuestros resultados, a pesar de no alcanzar la significación estadística, confirmaron la mayor incidencia de estas mutaciones en mujeres no fumadoras, no observándose en cambio ninguna correlación con características histológicas de los tumores, posiblemente debido al bajo número de tumores mutados. A pesar de que las características clínicas pueden ayudar a identificar pacientes que con mayor probabilidad pueden presentar mutaciones en *EGFR*, en ningún caso podrían ser consideradas criterios de selección de pacientes para una eventual terapia basada en ITKs ni reemplazar al análisis genético, ya que un número significativo de pacientes portadores de mutaciones presentan características clínicas diferentes a las anteriormente mencionadas (Rosell et al., 2009).

Además de los primeros ITKs erlotinib y gefitinib, y de la nueva generación de inhibidores irreversibles (Kwak et al., 2005; Engelman et al., 2007b; Li et al., 2008b; Sequist et al., 2010), se está contemplando el uso de otros fármacos dirigidos contra este receptor en NSCLCs, tales como el anticuerpo monoclonal cetuximab. Aunque los ensayos fase II en NSCLCs con este agente, ya aprobado para su uso en carcinomas de colon (Van Cutsem et al., 2009) o de cabeza y cuello (Bonner et al., 2006), no parecían mostrar diferencias en la supervivencia de los pacientes en comparación con la quimioterapia convencional, los últimos resultados de un ensayo fase III demuestran el beneficio en la supervivencia de la administración conjunta del anticuerpo en aquellos tumores que sobreexpresan EGFR (Pirker et al., 2009). Más

allá de sus implicaciones terapéuticas, estos resultados son relevantes porque demuestran que la expresión del receptor, que no presenta valor predictivo en relación con los ITKs, sí parece tenerlo en relación con los anticuerpos monoclonales. Se confirmaría así el diferente mecanismo de acción de ambos tipos de fármacos y se demostraría que todas las alteraciones moleculares descritas en un tumor pueden tener implicaciones en su tratamiento. Cada una de ellas parece ser característica de subgrupos moleculares diferentes y bien definidos en NSCLCs, por lo que pueden ser utilizadas en la selección de pacientes, según el contexto clínico, para la administración de distintos agentes terapéuticos dirigidos.

#### 5.2.2.2. KRAS

Con respecto al gen *KRAS*, la frecuencia de mutaciones encontrada (13.7%) fue similar a la descrita en ACs de pulmón (10-30%). Es interesante destacar que las transversiones tipo G a T, mayoritarias en esta y en otras series, corresponden a los cambios característicos de los ACs de pulmón de fumadores y representan una firma molecular de los efectos carcinogénicos del tabaco (Ahrendt et al., 2001). Nuestros resultados confirman la prevalencia de las mutaciones de *KRAS* en fumadores, si bien hay estudios que demuestran que estas mutaciones también aparecen en un porcentaje significativo de pacientes no fumadores (Riely et al., 2008), lo que indica nuevamente que las características clínicas no deben suponer un sesgo a la hora de identificar a los pacientes en los que realizar el análisis de una alteración genética que pueda ser relevante desde el punto de vista terapéutico.

En cáncer de pulmón, la presencia de mutaciones en *KRAS* se asocia con un peor pronóstico (Shepherd et al., 2005; Zhu et al., 2008), observación que parecen confirmar nuestros resultados. Por otra parte, su presencia se asocia con resistencia primaria a ITKs dirigidos contra EGFR (Pao et al., 2005). En este sentido, diversos ensayos han demostrado una peor respuesta a estos inhibidores en pacientes con mutaciones en *KRAS*, comparable a la observada en ausencia de mutaciones en *EGFR* (Shepherd et al., 2005; Hirsch et al., 2006; Zhu et al., 2008). De estos trabajos se deduce que, en el campo de los marcadores predictivos, tan importante es seleccionar a los pacientes que se van a beneficiar de una terapia como aquéllos en los que el tratamiento no va a ser eficaz (Shepherd & Tsao, 2010). Así, el impacto clínico de las mutaciones en *KRAS* estaría en que su presencia, tal y como confirman algunos de nuestros resultados, parece excluir la de otras alteraciones, como las mutaciones en *EGFR* o la amplificación de *MET*, o la translocación de *ALK*, tal y como se describe en la literatura (Roberts et al., 2010). No obstante, dado que aún no hay datos consistentes sobre el efecto de las mutaciones de *KRAS* sobre la supervivencia global de los pacientes tratados con ITKs, es necesario establecer con mayor precisión el valor predictivo real de estas mutaciones, no sólo en relación con los ITKs, sino también con los anticuerpos monoclonales dirigidos contra EGFR (cetuximab y panitumumab, entre otros). A diferencia de lo

que ocurre en cáncer de colon metastásico, el valor predictivo de las mutaciones de *KRAS* para la selección de pacientes para el tratamiento con estos anticuerpos en cáncer de pulmón no se ha demostrado (Khambata-Ford et al., 2010; O'Byrne et al. 2011). Quizás la justificación a esta diferencia pueda encontrarse en el diferente patrón de mutaciones que presenta este gen en ambos tipos tumorales o a diferencias en los mecanismos de activación de las vías de señalización controladas por *KRAS* en cada tumor: MEK/ERK y PI3K/AKT/mTOR (Shepherd & Tsao, 2010).

Más allá del papel de las mutaciones de *KRAS* como marcador predictivo en el contexto de las terapias dirigidas, parece claro que su presencia define un grupo de ACs de pulmón. Además, dado que tiene un papel clave en el control de las vías de señalización que regulan la proliferación y la supervivencia celular, y que estas mutaciones conducen a su activación constitutiva y a la desregulación de estos procesos celulares con la consiguiente transformación celular (Malumbres & Barbacid, 2003), *KRAS* parece representar una diana atractiva para el tratamiento de tumores y, en particular, de ACs de pulmón con mutaciones en este gen. A pesar de los esfuerzos realizados para el desarrollo de inhibidores, de momento no hay drogas dirigidas eficaces que tengan como diana *KRAS*. Por ello se están evaluando en ensayos clínicos como posibles dianas componentes de las dos principales vías efectoras de *KRAS*: MEK/ERK y PI3K/AKT/mTOR. Algunos abordajes realizados en líneas celulares parecen prometedores, como la inhibición conjunta de ambas vías (Engelman et al., 2008; Sos et al., 2009). Quizás se obtengan resultados más prometedores una vez que se identifiquen todas las proteínas activadas por *KRAS*. Recientes estudios preclínicos, en líneas celulares o modelos murinos, han permitido identificar proteínas que son claves en la señalización mediada por las mutaciones de *KRAS*, como CRAF (Blasco et al., 2011) o CDK4 (Puyol et al., 2010), y otras que parecen establecer una dependencia funcional con las mutaciones de *KRAS*, como STK33 (Scholl et al., 2009) o TBK1 (Barbie et al., 2009), de manera que la inhibición de estas proteínas en este contexto oncogénico puede conducir a la muerte celular. Todas estas proteínas podrían convertirse, por tanto, en dianas para el diseño de fármacos dirigidos que sean eficaces en NSCLCs inducidos por la activación de *KRAS*.

### 5.2.2.3. BRAF

La frecuencia de mutaciones en el gen *BRAF* identificada en esta serie (4.1%) fue similar a la descrita en otros estudios (<5%). Se confirmaron observaciones previas que indican que la mayoría de las mutaciones descritas en el dominio quinasa no se corresponden con el cambio V600E. De hecho ninguna de las mutaciones caracterizadas en esta serie fue V600E, mientras que en otros tumores donde la prevalencia de mutaciones en *BRAF* es relevante como melanoma (50-70%), cáncer de colon (15%) o de tiroides (30%), este cambio es el más frecuente (90%) (Davies et al., 2002). Asimismo, se confirmó la relación entre el hábito tabáquico y las mutaciones de *BRAF* en cáncer de pulmón, ya que las transversiones de G a C, subyacentes a los cambios

identificados en esta serie y en trabajos previos, se asocian con los efectos carcinogénicos del tabaco (Davies et al., 2002; Brose et al., 2002; Paik et al., 2011). Al analizar el contexto clínico-patológico en el que aparecen las mutaciones de *BRAF*, nuestros resultados también confirmaron el carácter mutuamente excluyente de las mutaciones en *BRAF*, *KRAS* y *EGFR* (Paik et al., 2011). La posible asociación entre la presencia de mutaciones en *BRAF* y un patrón de crecimiento micropapilar observada por otros autores (Travis et al., 2011), no ha podido confirmarse debido al bajo número de casos mutados encontrado en esta serie.

Las proteínas de la familia RAF (ARAF, BRAF, CRAF) poseen actividad quinasa específica de residuos de serina y treonina. Actúan como efectores de las proteínas RAS, mediando la activación de la vía MEK/ERK, que controla los procesos de proliferación o supervivencia celular. La mayoría de las mutaciones descritas en cáncer ocurren en el gen *BRAF* y parecen desempeñar, junto con otras alteraciones, un papel relevante en estadios iniciales de la carcinogénesis contribuyendo a su progresión y mantenimiento (Davies et al., 2002). La mayoría de las mutaciones descritas en *BRAF* conducen a la activación constitutiva de la proteína y, en consecuencia, a la estimulación continua de la vía MEK/ERK. Incluso aquellas mutaciones que parecen provocar una disminución en la actividad de BRAF conducen a la activación de la vía MEK/ERK a través de CRAF (Halilovic and Solit, 2008). La inactivación de BRAF bloquea la proliferación e induce la apoptosis de células tumorales, por lo que se ha convertido en una atractiva diana terapéutica. Se han hecho considerables esfuerzos para desarrollar inhibidores dirigidos contra BRAF, o algunos de sus efectores, que puedan ser eficaces en el tratamiento de tumores en los que la vía de señalización MEK/ERK está activa como consecuencia de las mutaciones en este gen. Existen datos preclínicos, que están siendo comprobados actualmente en ensayos clínicos en cáncer de pulmón, que sugieren que las mutaciones de *BRAF* podrían predecir sensibilidad a inhibidores de la vía MEK/ERK que actúan sobre las proteínas BRAF o MEK (Solit et al., 2006; Halilovic and Solit, 2008), como sorafenib, un agente antiangiogénico que actúa sobre distintas quinasas (RAF, PDGFR, CKIT y VEGFR). Pero quizás los resultados más prometedores corresponden al fármaco PLX4032, un inhibidor selectivo de BRAF que presenta una marcada actividad en melanoma metastásico portador de mutaciones V600E (Flaherty et al., 2010; Chapman et al., 2011). La mayoría de los ensayos clínicos se están realizando en melanoma debido a la elevada frecuencia de mutaciones en *BRAF* presente en este tumor. Aunque en cáncer de pulmón la frecuencia es significativamente menor, las mutaciones en *BRAF* parecen identificar claramente un subgrupo de tumores que podrían ser sensibles a un inhibidor selectivo de este tipo. No obstante, la menor incidencia de mutaciones V600E en cáncer de pulmón debe ser tomada en cuenta, ya que la actual generación de inhibidores de BRAF se ha desarrollado para actuar selectivamente sobre la proteína activada por la presencia de esta mutación en concreto. Dado que la carcinogénesis pulmonar relacionada con *BRAF* parece cualitativamente diferente a la de los melanomas, sería necesario comprobar la actividad clínica de estas drogas sobre mutaciones



diferentes a la V600E (Yang et al., 2010), y determinar si también pueden representar dianas de estos o de otros fármacos (Paik et al., 2011). De hecho, la diferente respuesta a un determinado agente terapéutico en presencia de distintos tipos de mutaciones caracterizadas en un mismo gen, se ha observado en otros genes como *EGFR* (Riely et al., 2006; Sharma et al., 2007; De Pas et al., 2011).

#### 5.2.2.4. PIK3CA

En relación con las alteraciones en el gen *PIK3CA* se observó una clara prevalencia de las mutaciones en SCCs. Considerando globalmente todos los tumores analizados, es interesante destacar que la frecuencia de mutaciones identificada (6.9%) fue ligeramente superior a la identificada en la serie sobre la que se realizó el estudio de la expresión génica (2.5%) y a la descrita previamente en cáncer de pulmón (<5%) (Samuels et al., 2004; Kawano et al., 2006; Okudela et al., 2007; Yamamoto et al., 2008), pero se mantuvo por debajo de la identificada en otros carcinomas epidermoides como los de cabeza y cuello (Qiu et al., 2006) o esófago (Phillips et al., 2006), donde supera el 10%. La mayor frecuencia de mutaciones identificada podría explicarse por la asociación existente con la histología epidermoide, ya que la proporción de SCCs en esta serie fue tres veces superior a la presente en la serie sobre la que se realizó el análisis de *microarrays*. Otro aspecto importante al comparar los resultados obtenidos en ambos estudios fue que la mayoría de las mutaciones identificadas en la serie sobre la que se realizó el estudio de dianas terapéuticas y marcadores predictivos se localizaron en los codones caracterizados como puntos caliente (542, 545 y 1047), mientras que el bajo número de mutaciones identificadas en la serie anterior no permitió constatar esta observación. Además, considerando los resultados de ambas series, es interesante señalar que las dos mutaciones identificadas en ACs (M1043I y R524K) o bien corresponden a las menos frecuentes o bien no habían sido previamente caracterizadas en cáncer de pulmón (<http://www.sanger.ac.uk/genetics/CGP/cosmic/>). En ambos casos, su presencia y la naturaleza somática de las mismas fueron confirmadas en productos de PCR independientes y al no estar presente en el tejido normal de cada uno de los pacientes. Estos resultados parecen sugerir diferencias en el patrón de mutaciones de *PIK3CA* en función del tipo histológico dentro de los carcinomas de pulmón, pudiendo implicar además diferencias en su naturaleza oncogénica. En relación con la presencia de mutaciones de *PIK3CA* en ACs, en estos dos tumores no se encontraron mutaciones en ninguno de los otros genes analizados. Estudios previos apuntan a la posible coexistencia entre mutaciones en *PIK3CA* y *EGFR*, por ejemplo (Kawano et al., 2006); no obstante, el reducido número de ACs con mutaciones en *PIK3CA* identificado en ambas series no permitió estudiar una posible relación entre las distintas alteraciones genéticas.

La frecuencia de amplificación del gen *PIK3CA* (38%) en SCCs fue similar a la identificada en la serie sobre la que se realizó el estudio de la expresión génica (42%) y a la descrita en estudios previos (Massion et al., 2002; Kawano et al. 2007; Okudela et al., 2007; Yamamoto et al., 2008). Esta concordancia, a pesar de las diferencias existentes entre los métodos empleados para el análisis y la naturaleza de las poblaciones estudiadas, parece confirmar la prevalencia de esta alteración en este tipo histológico dentro de los NSCLCs y apoyaría un importante papel en el desarrollo de estos tumores. En este sentido, es interesante destacar la importancia de unificar el criterio para caracterizar alteraciones como la amplificación génica. En el estudio de la expresión génica, en el que se utilizaron sondas derivadas de BACs, se encontró que sólo un incremento en el número de copias del gen por encima de siete resultaba en sobreexpresión concomitante, por lo que se estableció ese número de copias de *PIK3CA* como punto de corte para definir la amplificación. En el estudio de dianas terapéuticas y marcadores predictivos en NSCLCs se utilizó una sonda comercial y se estableció, en consecuencia, como punto de corte el ratio  $PIK3CA/CEP3 \geq 2$ , encontrándose que la mayoría de los tumores amplificados tenían siete o más copias del gen por núcleo, por lo que los resultados obtenidos previamente se confirmaron. Esta concordancia apoya la validez del ratio  $PIK3CA/CEP3 \geq 2$  como criterio para definir la amplificación génica de *PIK3CA*.

La relación entre las mutaciones de *PIK3CA* y la amplificación génica debe ser caracterizada en profundidad. Si bien nuestros resultados no mostraron que ambas alteraciones fueran mutuamente excluyentes, el número de tumores (3/115, 2.6%) que presentaron ambas alteraciones fue muy bajo en comparación con la observada en otros genes. Alrededor del 60% de los tumores con amplificación de *EGFR* presentan también mutaciones en el gen (Cappuzzo et al., 2005; Conde et al., 2006). El significado biológico de la posible coexistencia de ambas alteraciones no se conoce del todo, si bien el número de copias de *PIK3CA* identificado en los tumores que presentaban conjuntamente una mutación fue lo suficientemente alto como para pensar que sea un evento molecular que se origina al azar. Otra cuestión importante sería determinar si la amplificación es selectiva del alelo mutado o del *wild-type*. Por otro lado, el hecho de que la coexistencia entre amplificación y mutación sólo se haya encontrado en el caso de las mutaciones localizadas en el exón 9, podría indicar que las mutaciones localizadas en el dominio helical (exón 9) y en el dominio quinasa (exón 20) son funcionalmente diferentes.

*PIK3CA* codifica la subunidad catalítica de la proteína PI3K, una quinasa lipídica responsable de la fosforilación de PIP<sub>3</sub>, mediador clave entre receptores de factores de crecimiento y vías de señalización intracelular que controlan los procesos de proliferación celular y supervivencia. La vía PI3K/AKT/mTOR juega un papel importante en el crecimiento y el desarrollo normal, y su alteración se ha descrito en múltiples tumores, siendo un mecanismo esencial para la transformación celular (Engelman et al., 2006). La alteración de distintos componentes de esta vía de señalización, como la sobreexpresión de AKT fosforilado (David et

al., 2004) o la pérdida de *PTEN* (Bepler et al., 2004; Tang et al., 2006), se ha asociado con un peor pronóstico en NSCLCs y otros tumores. Nuestros resultados sugieren que, tanto las mutaciones como la amplificación de *PIK3CA*, podrían tener un significado pronóstico similar, que sería concordante con lo anteriormente descrito ya que ambas alteraciones tienen potencial oncogénico y conducen a la activación de la vía PI3K/AKT/mTOR (Samuels et al., 2005). La activación de la vía también se ha relacionado con resistencia a fármacos dirigidos, como los ITKs dirigidos contra EGFR en NSCLCs (Sos et al., 2009; Ludovini et al., 2011), los anticuerpos monoclonales dirigidos contra EGFR en cáncer de colon (Frattoni et al., 2007; Sartore-Bianchi et al., 2009), o los anticuerpos monoclonales dirigidos contra HER2 en cáncer de mama (Nagata et al., 2004; Berns et al., 2007; Eichhorn et al., 2008). Esta situación se justificaría por las conexiones existentes entre distintas vías de señalización intracelular y apoyaría el uso de terapias combinadas, con fármacos dirigidos a componentes de distintas vías de señalización, como una adecuada estrategia terapéutica (Engelman, 2007; Halilovic et al., 2010). Pero más allá de su papel en la resistencia a distintos fármacos, la inhibición de la vía de PI3K se contempla como una estrategia terapéutica prometedora en NSCLC y en otros tumores dependientes de la desregulación de la vía PI3K/AKT/mTOR. Existen diferentes grupos de drogas dirigidas contra distintos componentes de la vía (PI3K, AKT, mTOR, etc), si bien la forma más directa de inhibirla es a través de fármacos dirigidos contra PI3K o AKT, considerados globalmente como inhibidores de PI3K. Resultados preclínicos prometedores han permitido que diversos fármacos (XL147, BEZ235, GDC-0941) pasen a fase de desarrollo clínico, aunque los resultados iniciales no muestran tasas de respuesta significativas (Markman et al., 2010). Esto indica, por un lado, que las oportunidades para bloquear farmacológicamente la vía requieren un mejor conocimiento de sus mecanismos de activación en distintos tipos tumorales, de su regulación y de las conexiones con otras vías de transducción de señales. Por otro lado, subraya la necesidad de disponer de un marcador predictivo de respuesta que permita seleccionar a los pacientes para una eventual terapia dirigida contra la vía PI3K/AKT/mTOR. Algunos resultados apuntan a que un tratamiento basado en la inhibición de la vía es más eficaz en tumores con mutaciones en *PIK3CA* (Janku et al., 2011b), si bien nuestros resultados muestran que la mayor prevalencia de la amplificación del gen *PIK3CA* frente a las mutaciones convertiría a dicha alteración en un mejor marcador predictivo de respuesta, que debería ser evaluado en ensayos clínicos prospectivos. De confirmarse su valor predictivo, cobraría especial importancia la necesidad de definir un criterio para evaluar la amplificación, tal y como se apuntaba anteriormente, ya que sería el requisito necesario para seleccionar de forma precisa a los pacientes candidatos a una eventual terapia dirigida contra PI3K.

Nuestros resultados confirman, en cualquier caso, la relevancia de las alteraciones de *PIK3CA* en NSCLCs, donde parece definir un subgrupo de tumores. El hecho de que ambas alteraciones sean características de SCCs tiene especial importancia. La mayoría de las proteínas

que son dianas de fármacos dirigidos disponibles actualmente para el tratamiento del cáncer de pulmón, como EGFR o ALK, se encuentran alteradas preferentemente en ACs, por lo que los avances terapéuticos en cáncer de pulmón no se han extendido a otros tipos histológicos, como SCCs. El menor conocimiento del genoma de los SCCs en comparación con el de los ACs justifica esta desigualdad ya que se conocen pocas alteraciones específicas que puedan ser consideradas como eventos conductores de la carcinogénesis pulmonar epidermoide (Weir et al., 2007; Ding et al., 2008). Por ello, la identificación de alteraciones características de este tipo histológico, como las mutaciones y/o amplificación de *PIK3CA* aquí mostrada, la sobreexpresión de IGF-1R (que se tratará más adelante), o recientes hallazgos como la amplificación de *FGFR1* (Weiss et al., 2010) o las mutaciones en *DDR2* (Hammerman et al., 2011), abren la posibilidad a que sean dianas o marcadores predictivos para el desarrollo de terapias eficaces en SCCs (Pao et al., 2011; Ohashi & Pao, 2011).

#### 5.2.2.5. MET

En nuestro estudio se observó que sólo una pequeña proporción de los NSCLCs analizados mediante técnica de SISH mostró amplificación del gen *MET* (4.6%), una frecuencia que es consistente con la descrita en trabajos previos en los que se analizó la amplificación de este gen en el mismo contexto clínico: NSCLC resecaados, correspondientes a estadios iniciales, que no habían recibido tratamiento farmacológico previo (Cappuzzo et al., 2009; Go et al., 2010; Onitsuka et al., 2010). No obstante, es interesante señalar que la frecuencia de amplificación de *MET* descrita en diferentes estudios es muy variable, con un rango comprendido entre el 3% y el 21% (Bean et al., 2007; Weir et al., 2007; Beau-Faller et al., 2008; Cappuzzo et al., 2009; Go et al., 2010; Onitsuka et al., 2010). Esta variabilidad puede justificarse por los diferentes métodos de detección utilizados (PCR cuantitativa en tiempo real, CGH o FISH), y por los diferentes criterios de interpretación empleados. Teniendo en consideración este último punto, es importante destacar que en el presente trabajo se optó por comparar distintos criterios para la valoración del número de copias de *MET* y definir su amplificación. Además del ratio SISH *MET/CEP7* y del número de copias del gen por núcleo, se consideraron dos criterios establecidos por dos grupos independientes con amplia experiencia en la interpretación de técnicas de hibridación (Cappuzzo et al., 2009; Go et al., 2010). Después de comparar todos los resultados, se estableció como criterio para definir la verdadera amplificación de *MET* el ratio SISH *MET/CEP7*  $\geq 2$ . La utilización de distintos criterios se consideró relevante para poner de manifiesto nuevamente que, a día de hoy, y tal y como ocurre con otras alteraciones genéticas, no existe un consenso para evaluar el número de copias de *MET* y definir su amplificación en NSCLC y en otros tumores, requisitos imprescindibles para valorar el posible papel pronóstico o predictivo de esta alteración. Por otro lado, también sería relevante determinar si las diferentes frecuencias encontradas se

podrían justificar en que la amplificación de *MET* es una alteración característica de estadios avanzados, tal y como sugieren algunos estudios (Agarwal et al., 2009; Cappuzzo et al., 2009), lo que sería relevante de cara a definir la población a estudiar.

Al igual que en estudios previos, se encontró que la amplificación de *MET* ocurre tanto en ACs como en SCCs (Beau-Faller et al., 2008; Cappuzzo et al., 2009), y que, en ACs, ocurre de forma independiente de otras alteraciones en otros genes relevantes como *EGFR* o *KRAS* (Cappuzzo et al., 2009; Onitsuka et al., 2010). El carácter mutuamente excluyente de alteraciones en estos genes parece confirmar que existen diferentes formas de carcinogénesis en el desarrollo de los distintos grupos de ACs de pulmón.

El gen *MET* codifica un receptor con actividad tirosina quinasa que, a través de la activación de las vías de señalización intracelular PI3K/AKT/mTOR y KRAS/MEK/ERK, promueve la proliferación y la supervivencia celular. *MET* está implicado en el desarrollo y contribuye a la homeostasis y a la regeneración tisular en distintos tipos celulares. La desregulación de la señalización mediada por *MET* contribuye a la progresión tumoral ya que, al aumentar la proliferación e inhibir la apoptosis, promueve el crecimiento y el desarrollo de metástasis (Agarwal et al., 2009; Peruzzi & Bottaro, 2006). Se han descrito diferentes alteraciones de *MET*, incluyendo mutaciones, amplificación y sobreexpresión, en distintos tipos tumorales (gástrico, colon y NSCLCs, entre otros). En contraste con otros tipos de carcinomas, las mutaciones en el dominio quinasa son poco frecuentes en NSCLCs y su significado aún está por establecerse (Ding et al., 2008; Onozato et al., 2009). Por su parte, la amplificación del gen, más allá de su papel en la carcinogénesis, tiene especial relevancia ya que se ha identificado como el principal mecanismo, junto con la mutación T790M en el gen *EGFR*, de resistencia a ITKs dirigidos contra *EGFR*. La amplificación de *MET* se ha identificado en el 20% de los pacientes con carcinomas de pulmón resistentes a estos inhibidores (Engelman et al., 2007a), aunque, como muestran nuestros resultados y se ha indicado anteriormente, también ocurre, aunque en menor frecuencia, en pacientes no tratados. Resultados recientes demuestran que la amplificación de *MET*, al igual que la mutación de resistencia T790M, puede detectarse a bajos niveles en NSCLCs antes del inicio del tratamiento con ITKs (Turke et al., 2010; Maheswaran et al., 2008). La existencia previa al tratamiento con ITKs de la amplificación de *MET* sugeriría que esta alteración puede estar presente de forma minoritaria en algunas células del tumor, cuyo crecimiento se ve favorecido durante la administración del tratamiento siendo, por tanto, responsable de la aparición final de la resistencia.

Algunos estudios han establecido que la amplificación de *MET* tiene un valor pronóstico negativo en NSCLCs (Cappuzzo et al., 2009; Go et al., 2010). Nuestros resultados, a pesar de no alcanzar la significación estadística, apoyarían estas observaciones ya que se encontró que los tumores con amplificación de *MET* se caracterizaron por presentar una tendencia hacia una menor supervivencia global cuando se analizaba la alteración en el grupo de pacientes fallecidos durante

el estudio. La identificación de la amplificación de *MET* como una alteración relevante en un subgrupo de carcinomas de pulmón, su valor pronóstico y su papel como marcador de resistencia para algunos fármacos dirigidos ha motivado que *MET* también pase a ser considerado como una diana prometedora para el desarrollo de fármacos dirigidos en NSCLCs. Estudios realizados con líneas celulares demuestran que la presencia de la amplificación confiere susceptibilidad a inhibidores de MET (McDermott et al., 2007). En la actualidad se están valorando distintos abordajes terapéuticos, entre los que se incluyen anticuerpos monoclonales, ITKs y antagonistas que bloquean la interacción entre el receptor y sus efectores, y se está contemplando la administración de estos fármacos en combinación con otros dirigidos contra otras dianas alteradas en el tumor para conseguir así un efecto terapéutico eficaz (Tang et al., 2008; Karamouzis et al., 2009). La mayoría de los inhibidores están en una fase temprana de su desarrollo clínico, pero quizás los resultados más prometedores correspondan a la combinación de un anticuerpo monoclonal dirigido contra MET y un ITK dirigido contra EGFR (Spigel et al., 2010), a la combinación de ITKs dirigidos contra MET (ARQ197) y EGFR (erlotinib) (Schiller et al., 2010), o al inhibidor crizotinib, desarrollado como un agente dirigido contra ALK pero que también muestra actividad sobre MET (Ou et al., 2011). Estos fármacos podrían suponer una opción terapéutica para aquellos carcinomas de pulmón con alteraciones en el gen *MET*, más allá de permitir contrarrestar una eventual resistencia a otros inhibidores. Para ello, es necesario que los ensayos clínicos en desarrollo identifiquen el marcador predictivo que permita seleccionar a los pacientes que van a beneficiarse de esta terapia. La mayor prevalencia de la amplificación génica de *MET* frente a las mutaciones parece justificar que sea considerada el marcador predictivo de elección. En este sentido, algunos estudios *in vitro* apoyarían esta observación ya que demuestran que la actividad de crizotinib se restringe a células con amplificación de este gen (Tanizaki et al., 2011). La consideración de la amplificación de *MET* como posible marcador predictivo representaría un reto ya que, como se ha apuntado anteriormente, es necesario establecer cuál es el mejor método de estudio, así como definir el criterio que permita identificar una amplificación de *MET* relevante desde el punto de vista clínico (Engelman & Jänne, 2008). Nuestro estudio confirmaría la utilidad del ratio *MET/CEP7*, que es un punto de corte ampliamente aceptado al evaluar técnicas de hibridación; además de demostrar la utilidad de la técnica de SISH como alternativa al FISH para el estudio de alteraciones en el número de copias en este u otros genes y en distintos tipos de tumores, tal y como confirman otros estudios (Yamamoto et al., 2011; García-García et al., 2011). Además del posible valor predictivo de las mutaciones o de la amplificación del gen *MET*, recientes estudios parecen confirmar la relación de la expresión proteica de MET con la respuesta a anticuerpos monoclonales dirigidos contra el receptor (Spigel et al., 2010). De forma similar a lo anteriormente indicado para *EGFR*, estos resultados apuntarían a que el marcador predictivo de respuesta puede ser diferente en función del agente terapéutico dirigido estudiado.

#### 5.2.2.6. IGF-1R

Un gran porcentaje de los SCCs analizados (70%) mostró positividad para la expresión de IGF-1R, en concordancia con estudios previos (Gong et al., 2009; Cappuzzo et al., 2010; Gualberto et al., 2010; Dziadziuszko et al., 2010). La señalización mediada por este receptor con actividad tirosina quinasa implica la activación de múltiples vías intracelulares que estimulan la proliferación celular y previenen la apoptosis. En consecuencia, la señalización a través de IGF-1R juega un importante papel en el crecimiento y en el desarrollo normal, así como en el inicio y la progresión de distintos tipos de tumores, incluyendo a los NSCLCs (Dziadziuszko et al., 2008; Pollak, 2008; Chitnis et al., 2008).

La activación de la vía de IGF-1R parece, asimismo, relacionarse con resistencia a distintas formas de terapia, como por ejemplo ITKs dirigidos contra EGFR, ya que IGF-1R puede activar la vía de PI3K/AKT/mTOR en ausencia de la señalización mediada por EGFR, estimulando la proliferación celular (Guix et al., 2008). IGF-1R representa, por tanto, una diana atractiva ya que su inhibición, en combinación con la de otras dianas, podría bloquear el crecimiento y la supervivencia de células tumorales en las que las vías RAS/MEK/ERK y PI3K/AKT/mTOR estén activadas. La demostración de que IGF-1R está implicado en la transformación maligna y la frecuente expresión del receptor en distintos tipos tumorales han impulsado el desarrollo de terapias dirigidas contra IGF-1R. En NSCLCs, las distintas estrategias terapéuticas incluyen anticuerpos monoclonales e ITKs (Gualberto & Pollak, 2009). De forma similar a lo anteriormente descrito para el resto de dianas, en el caso de IGF-1R también se está evaluando el efecto de la combinación de inhibidores de este receptor con otros agentes terapéuticos (Ramalingam et al., 2011). Quizás los resultados más prometedores corresponden al anticuerpo monoclonal figitumumab, responsable de la tasa de respuesta y del incremento significativo en la supervivencia libre de progresión observados en pacientes en estadios avanzados de NSCLC, principalmente SCCs, tratados con el anticuerpo en combinación con quimioterapia (Karp et al., 2009). Más allá de las implicaciones terapéuticas de este ensayo, sus resultados confirman que la desregulación de la vía mediada por IGF-1R es un evento común en SCCs de pulmón, y que la mayor expresión de este receptor en SCCs proporciona el trasfondo biológico para la mayor sensibilidad a los agentes dirigidos contra IGF-1R en este grupo de pacientes observada en ensayos clínicos (Karp et al., 2009; Cappuzzo et al., 2010). Quedaría así justificado que el análisis de la expresión proteica de IGF-1R aquí presentado se haya restringido a los tumores de este tipo histológico. Lamentablemente estos resultados no se han confirmado en los sucesivos ensayos fase III y el desarrollo de inhibidores eficaces se está viendo frenado. Esta situación pone de manifiesto por un lado que, dado el importante papel que desempeña IGF-1R regulando procesos esenciales de la homeostasis sistémica, es necesario conocer los mecanismos de regulación de la vía, así como la posible relación con alteraciones en otros componentes de las

vías de señalización KRAS/MEK/ERK y PI3K/AKT/mTOR, para maximizar la eficacia y la seguridad de su inhibición (Pollak, 2008). Además, indica que, a pesar de haber identificado un grupo de tumores en los que IGF-1R parece representar un papel relevante, aún no se ha caracterizado el marcador predictivo que permita identificar a los pacientes que van a responder, garantizando así el éxito de los ensayos clínicos (Gualberto & Pollak, 2009). Estudios previos con líneas celulares indican que la expresión de IGF-1R puede predecir la respuesta a su inhibición en NSCLCs (Gong et al., 2009), tal y como se ha observado en otros tipos tumorales (Zha et al., 2009). Los ensayos clínicos que se realicen deben evaluar en profundidad el valor predictivo de la expresión de IGF-1R o de otros marcadores relacionados (Gualberto et al., 2010).

Por otro lado, los resultados aquí presentados evidenciaron que los pacientes con SCCs en estadios iniciales con expresión de IGF-1R presentaban una tendencia, no estadísticamente significativa, a mostrar un mejor pronóstico. Otros estudios indican la existencia de una relación entre la supervivencia y el incremento en el número de copias de IGF-1R en este contexto clínico (Dziadziuszko et al., 2010). Más allá de la posible relación entre la amplificación génica y la sobreexpresión de IGF-1R, el valor pronóstico de IGF-1R aún resulta controvertido. Estudios previos han mostrado que la expresión de IGF-1R se asocia con una mayor supervivencia en pacientes con NSCLC en estadios avanzados tratados con gefitinib (Cappuzzo et al., 2006), mientras que la co-expresión de EGFR e IGF-1R en estadios iniciales se relaciona con una peor supervivencia libre de progresión (Ludovini et al., 2009). Diferencias en la metodología y en las características clínicas de los tumores analizados podría justificar la falta de concordancia encontrada hasta el momento. Por ello, el valor pronóstico positivo de la expresión de IGF-1R sugerido por nuestros resultados, debería ser confirmado, así como evaluado en el contexto de la enfermedad avanzada.

El análisis de marcadores predictivos aquí presentado pone de manifiesto la importancia de definir la frecuencia de las alteraciones genéticas más relevantes en cáncer de pulmón, el contexto clínico, patológico y molecular en el que aparecen, así como su valor pronóstico y terapéutico. Esta información podría completar y mejorar la clasificación de los carcinomas de pulmón, en la actualidad basada casi exclusivamente en los hallazgos anatomopatológicos y sin reflejar la heterogeneidad molecular de estos tumores, a diferencia de lo que ocurre en otras neoplasias como las hematológicas, hasta el punto de poder sentar las bases, junto con la morfología, de una futura clasificación de los carcinomas de pulmón (Dacic, 2011). Nuestros resultados, así como el de otros estudios similares (D'Angelo et al., 2011; Kim et al., 2011), confirman además que, en el cáncer de pulmón es posible caracterizar de forma prospectiva todas aquellas alteraciones genéticas y/o moleculares relacionadas con la respuesta a fármacos dirigidos en una serie de tumores en estadios iniciales, siendo su utilidad clínica innegable ya que mejoraría la tasa de respuesta en subgrupos de tumores molecularmente definidos (Govindan, 2010; Pao et al., 2009; Von Hoff et al., 2010). Tal y como se ha comprobado en otros tumores (Blank et al.,



2011), el análisis secuencial y priorizado de biomarcadores en cáncer de pulmón, una vez establecido el diagnóstico, podría resultar coste-efectivo por sus implicaciones terapéuticas, debiendo analizarse este punto con mayor profundidad.

### 5.3. APROXIMACIONES METODOLÓGICAS AL ESTUDIO DE MARCADORES PREDICTIVOS EN CÁNCER: ANÁLISIS DE MUTACIONES EN *EGFR* EN CÁNCER DE PULMÓN

La necesidad de caracterizar alteraciones en un número cada vez mayor de genes (*EGFR*, *KRAS*, *BRAF*, *C-KIT*, *PIK3CA* entre otros) en pacientes con tumores sólidos para determinar su respuesta a un determinado tratamiento es ya una realidad (Lièvre et al., 2006; Di Nicolantonio et al., 2008; Heinrich et al., 2008; Hirsch & Bunn, 2009; Sartore-Bianchi et al., 2009). A pesar de la importancia clínica de estos marcadores predictivos, su estudio presenta ciertas limitaciones. Existen múltiples métodos para caracterizar mutaciones somáticas y sus parámetros analíticos no siempre están evaluados en el contexto clínico (Eberhard et al., 2008). Además, la falta de estandarización y de controles de calidad que aseguren la reproducibilidad de los resultados son patentes (Eberhard et al., 2008), una situación llamativa especialmente si se compara con el diagnóstico de enfermedades hematológicas o infecciosas (Leonard, 2009a, Leonard, 2009b, Leonard, 2009c). En el caso concreto del cáncer de pulmón, tal y como se ha destacado a lo largo de este trabajo, el análisis de mutaciones en el gen *EGFR* resulta imprescindible para establecer la mejor estrategia terapéutica para el paciente. Dado que aún no se ha establecido cuál es la metodología más sensible y específica para su detección, se propuso la realización de un análisis de mutaciones mediante tres técnicas (secuenciación directa, PCR cuantitativa en tiempo real e IHQ), comparando la sensibilidad de las mismas en el contexto clínico real.

La prevalencia de mutaciones en *EGFR* encontrada (~15%) fue similar a la descrita en estudios previos realizados sobre NSCLCs avanzados (Shepherd et al., 2005; Thatcher et al., 2005; Mok et al., 2009; Rosell et al., 2009; Mitsudomi et al., 2010; Rosell et al., 2011), siendo las deleciones en el exón 19 y la mutación puntual L858R en el exón 21 las más frecuentes en concordancia con lo descrito previamente (Sharma et al., 2007). La sensibilidad experimental del kit *Therascreen EGFR Mutation Test* fue del 5% para todas las muestras analizadas, siendo ésta mucho mayor que la obtenida para la secuenciación directa, que sólo pudo detectar el 63% de las mutaciones identificadas cuando el ADN tumoral representaba una proporción relativa del 30% con respecto al total de ADN analizado. Estas observaciones coinciden con las de estudios previos donde comparan distintos métodos para caracterizar mutaciones en *EGFR* (Pan et al., 2005; Kimura et al., 2006a; Yu et al., 2009; Brevet et al., 2010; Miyamae et al., 2010). La sensibilidad global de la IHQ para la detección específica de la delección E746-A750 y de la mutación L858R fue de aproximadamente del 70% y del 57%, si se comparaba con los resultados de la

secuenciación directa y del kit, respectivamente, siendo la especificidad de ambos anticuerpos del 100%. En comparación con trabajos previos (Yu et al., 2009; Brevet et al., 2010; Kato et al., 2010; Kawahara et al., 2010; Kitamura et al., 2010; Simonetti et al., 2010), se observa que la sensibilidad encontrada aquí es más baja, especialmente la del anticuerpo dirigido contra la mutación L858R (40%), mientras que la especificidad de ambos es la más alta. En este sentido, una elevada especificidad de la IHQ reforzaría su utilidad para analizar pacientes con NSCLCs, al evitar posibles resultados falsos positivos que harían que el paciente fuera considerado erróneamente como candidato a recibir una terapia basada en ITKs. En el caso de un resultado negativo de la IHQ, se podría hacer un segundo análisis, basado esta vez en una técnica molecular como las aquí empleadas.

Al evaluar las distintas opciones analíticas de un método para detectar mutaciones en *EGFR*, o en otros genes, es necesario considerar varios aspectos. En primer lugar, la sensibilidad analítica alcanzada, puesto que va a determinar el porcentaje de celularidad tumoral mínimo necesario para que se detecte la mutación. Aunque recientemente se está empezando a cuestionar el uso de la secuenciación directa (Whitehall et al., 2009), resulta llamativo que continúe siendo la técnica de referencia para el estudio de mutaciones en *EGFR* y en otros genes a pesar de su menor sensibilidad. La situación, no obstante, podría cambiar con la llegada de procedimientos de secuenciación más sofisticados y sensibles (ten Bosch et al., 2008). Es importante destacar que, frente a otros estudios de sensibilidad realizados con líneas celulares o ADN plasmídico (Pan et al., 2005; Lièvre et al., 2008; Lamy et al., 2009), el uso de diluciones seriadas partiendo de ADN extraído de tumores con y sin mutaciones en *EGFR* subraya la validez de la aproximación seguida en este trabajo al reflejar la naturaleza de las muestras que se manejan en un laboratorio de diagnóstico (Angulo et al., 2010). La necesidad de métodos sensibles para el estudio de mutaciones en pacientes con carcinoma de pulmón es especialmente relevante si se tiene en cuenta que el porcentaje de celularidad de muchas de las muestras remitidas para su análisis, mayoritariamente biopsias pequeñas, puede resultar limitante (Eberhard et al., 2008; Loo et al., 2010; Nicholson et al., 2010; Terry et al., 2010; Conde et al., 2010). Aunque existen procedimientos, como la macrodissección, para enriquecer la proporción de células tumorales (Angulo et al., 2010), la naturaleza de las muestras de cáncer de pulmón disponibles para el diagnóstico y los estudios moleculares hace que no siempre sea posible y que no pueda alcanzarse el porcentaje mínimo requerido para hacer un análisis por secuenciación. Así, en nuestro estudio sólo se pudo hacer macrodissección en el 2% de las biopsias pequeñas. Para asegurar una adecuada sensibilidad del método empleado es imprescindible, por tanto, un estricto control morfológico. El patólogo debe evaluar la muestra disponible, no sólo para determinar el porcentaje tumoral, sino también para valorar la presencia de fibrosis o de infiltrado linfocitario, ya que también pueden afectar a la sensibilidad de la detección de mutaciones (Miyamae et al., 2010; Angulo et al., 2010). Frente a los abordajes basados en PCR, la IHQ permite ese control morfológico, por lo que

supone una alternativa para muestras con una proporción de tumor poco representativa (Brevet et al., 2010; Kawahara et al., 2010). Además del contenido tumoral relativo en la muestra, otros factores importantes que potencialmente pueden afectar al estudio de mutaciones son la calidad y cantidad de ADN extraído. Para este estudio se analizaron los dos tipos principales de muestras, piezas quirúrgicas y biopsias pequeñas, confirmándose que en ambos casos se puede obtener ADN de calidad y en cantidad suficientes. No obstante, debe hacerse hincapié en el desarrollo de abordajes de PCR que amplifiquen fragmentos de menor tamaño y asegurar así la obtención de productos aunque el ADN se encuentre especialmente fragmentado, algo frecuente en el caso de muestras FFPE (Eberhard et al., 2008; Pirker et al., 2010). Nuestros resultados demuestran que el kit fue capaz de caracterizar uno de los tumores que no pudieron ser analizados por secuenciación, hecho que podría explicarse porque los productos de PCR amplificados por este método basado en PCR cuantitativa en tiempo real son más pequeños que los amplificados por PCR convencional, al menos según el protocolo seguido en este estudio [180, 154, 236 y 205 pares de bases para los exones 18, 19, 20 y 21, respectivamente, (Conde et al., 2006)], si bien los tamaños de los productos amplificados con el kit no son especificados por el fabricante. Por eso, para este tumor en concreto, es posible que el ADN extraído estuviera demasiado fragmentado para su amplificación por PCR convencional pero no por PCR cuantitativa en tiempo real, permitiendo así la caracterización del gen *EGFR*. Por otro lado, es importante señalar que un insuficiente rendimiento en la extracción de ADN, algo común en el caso de las biopsias pequeñas tal y como se ha comprobado, puede dar lugar a artefactos, especialmente si se emplean métodos poco sensibles como la secuenciación (Akbari et al., 2005; Marchetti et al., 2006; Pirker et al., 2010). Frente a las limitaciones que ofrece el análisis de muestras FFPE, se están desarrollando técnicas basadas en la detección de mutaciones en sangre y/o células tumorales circulantes (Kimura et al., 2006b; Maheswaran et al., 2008), que permitirían un análisis genético menos invasivo de pacientes con cáncer de pulmón u otros tumores. Además, estas técnicas ofrecerían la posibilidad de realizar nuevos análisis para monitorizar la respuesta a un fármaco o en caso de recidiva de la enfermedad (Sequist et al., 2009). No obstante, las consideraciones relativas a la sensibilidad de los métodos de detección que acaban de plantearse hacen que estos abordajes aún se realicen en el ámbito de la investigación.

La necesidad de un método de análisis de mutaciones sensible también parece justificarse si se introduce una cuestión que está despertando un intenso debate: la heterogeneidad intratumoral de las alteraciones moleculares. Algunos estudios han demostrado que las mutaciones activadoras de *EGFR* aparecen a lo largo del proceso de carcinogénesis, por lo que sólo parte de las células tumorales presentan la mutación (Taniguchi et al., 2008; Jiang et al., 2008; Zhou et al., 2011). Por tanto, si la abundancia de células con la alteración fuera baja podría no detectarse la mutación, aun en presencia de una proporción de células tumorales adecuada a la sensibilidad analítica del método empleado. En este sentido, la tinción observada para el

anticuerpo dirigido contra la mutación L858R parece confirmar la heterogeneidad de, al menos, esta alteración de *EGFR*, observación que es consistente con resultados previos que muestran que la proteína EGFR mutada, detectada mediante IHQ con anticuerpos específicos, se expresa de forma heterogénea en los tumores (Azuma et al., 2011). Se justificaría así la menor sensibilidad de este anticuerpo en comparación con el dirigido contra la delección E746-A750, y los resultados obtenidos por otros grupos que emplearon TMAs para analizar la presencia de mutaciones por IHQ (Yu et al., 2009; Brevet et al., 2010; Kato et al., 2010; Kitamura et al., 2010). El uso de TMAs en lugar de secciones completas podría conducir a un mayor número de resultados falsos negativos si las células tumorales presentes en las áreas seleccionadas para su construcción no presentan la alteración. Además, esta heterogeneidad también condiciona la valoración de la IHQ, por lo que abordajes como el aquí presentado o el propuesto por otros autores (Azuma et al., 2011), en los que se evalúe tanto la proporción de células inmunorreactivas como la intensidad de la tinción, representan la mejor opción. Asimismo, los resultados obtenidos en el estudio de sensibilidad confirmarían estas observaciones ya que fue necesaria una mayor proporción relativa de ADN mutado para detectar las mutaciones L858R por los dos métodos basados en PCR. La heterogeneidad de las mutaciones en *EGFR* representa un factor a tener en cuenta en la elección del método de caracterización de la alteración, pero también a la hora de evaluar el distinto grado de respuesta y el beneficio de los ITKs puesto que, incluso la presencia de un bajo número de alelos mutados, insuficiente para su detección por métodos como la secuenciación directa, podría relacionarse con la respuesta al fármaco en cuestión (Miyamae et al., 2010; Azuma et al., 2011).

En tercer lugar, habría que considerar la sensibilidad biológica, que plantea un debate sobre si son suficientes los métodos que detectan las mutaciones más frecuentes, como el caso del kit *Therascreen EGFR Mutation Test* o la IHQ, o se debe aspirar a analizar todas las posibles alteraciones genéticas con una técnica de secuenciación. El uso del kit o de la IHQ se vería limitado porque sólo detectan las mutaciones para las que han sido diseñados los *primers* o los anticuerpos, respectivamente, de manera que ofrecerían un resultado falso negativo para el resto de mutaciones. El kit además no permite distinguir entre los distintos tipos de delecciones o inserciones caracterizadas en *EGFR*. Es, por tanto, necesario conocer el significado de las distintas alteraciones descritas en *EGFR* en relación con la respuesta a ITKs. Las delecciones en el exón 19 y la mutación L858R representan el 85-90% de las mutaciones descritas y se asocian con sensibilidad a estos inhibidores, mientras que otras alteraciones, como la mutación T790M y algunas inserciones en el exón 20 se relacionan con resistencia a estos inhibidores. Las implicaciones clínicas de muchas de las mutaciones poco frecuentes están aún por determinar (Sharma et al., 2007; Yasuda et al., 2011). Recientemente se ha descrito la actividad de ITKs en tumores con mutaciones en *EGFR* poco frecuentes, con detalles sobre el manejo clínico y la evolución de los pacientes (De Pas et al., 2011). Estos resultados son de gran utilidad ya que pueden ayudar a determinar la relevancia clínica de las distintas mutaciones descritas en *EGFR* y

permitir una valoración más precisa de los que supone que un método detecte todas o sólo ciertas mutaciones.

Por último, la creciente demanda en los tiempos de respuesta plantea la necesidad de que el método de análisis ofrezca un resultado preciso en el menor tiempo posible. A la hora de valorar la rapidez en el tiempo de respuesta debe considerarse el flujo de trabajo de la técnica, los requerimientos técnicos y la experiencia necesaria para la interpretación de los resultados. La secuenciación directa es una técnica accesible pero requiere experiencia para la interpretación de los resultados e implica múltiples etapas que retrasan el tiempo de respuesta. El kit *Therascreen EGFR Mutation Test* ofrece una mayor rapidez y la posibilidad de automatizar el análisis. Además dispone de marcado CE por lo que la reproducibilidad de sus resultados queda asegurada. No obstante, los requerimientos técnicos y su coste hacen que aún sea una técnica poco accesible (Eberhard et al., 2008; Pirker et al., 2010). La IHQ, dado que se utiliza de forma rutinaria en los departamentos de Anatomía Patológica, es accesible y puede automatizarse, proporcionando un resultado rápido. No obstante, la variabilidad inherente de esta técnica debe considerarse de cara a valorar su interpretación (Brevet et al., 2010).

En conclusión, con independencia del método empleado para el análisis de mutaciones en *EGFR*, resulta imprescindible validar en el entorno clínico real su sensibilidad, especificidad y su puesta en práctica en la rutina de diagnóstico. Es necesario protocolizar las fases pre-analítica, analítica y post-analítica, además de disponer de controles de calidad que aseguren la reproducibilidad y precisión de los resultados, siendo la colaboración entre los distintos especialistas implicados (clínicos, patólogos, biólogos) clave para garantizar un adecuado estudio molecular (Eberhard et al., 2008; Pirker et al., al., 2010). Así, el estudio del biomarcador que ha revolucionado la terapia en cáncer de pulmón, y que sirve como referencia para el estudio de otras alteraciones genéticas en el contexto de las terapias dirigidas, podría sentar las bases para el correcto análisis de otros marcadores predictivos.



## **6. CONCLUSIONES**





1. El gen *P63* presentó una expresión significativamente mayor en los carcinomas epidermoides de pulmón al comparar los perfiles de expresión génica de este tipo histológico con los de los adenocarcinomas de pulmón.
2. En este contexto, la expresión proteica de P63 estudiada mediante inmunohistoquímica permitió reclasificar como carcinomas epidermoides el 50% de los carcinomas de pulmón de células grandes.
3. El gen *PIK3CA* presentó una expresión significativamente mayor en los carcinomas epidermoides de pulmón al comparar los perfiles de expresión génica de este tipo histológico con los de los adenocarcinomas de pulmón. Esta sobreexpresión se correlacionó con la amplificación del gen, determinada por técnica de hibridación *in situ* fluorescente, alteración que, a su vez, no fue mutuamente excluyente con la presencia de mutaciones en el gen *PIK3CA*.
4. Los carcinomas epidermoides de pulmón con amplificación del gen *PIK3CA* presentaron una tendencia, no estadísticamente significativa, a una peor supervivencia global ( $p=0.28$ ).
5. La amplificación del gen *MET*, estudiada mediante técnica de hibridación *in situ* con plata, se observó tanto en adenocarcinomas como en carcinomas epidermoides de pulmón. En los adenocarcinomas, la amplificación de *MET* (6.3%) no coexistió con mutaciones en los genes *EGFR* o *KRAS*. En los carcinomas epidermoides, la amplificación de *MET* (3.3%) fue mutuamente excluyente con la presencia de alteraciones en el gen *PIK3CA* (mutaciones y/o amplificación génica).
6. Los carcinomas de pulmón no microcíticos con amplificación del gen *MET* (4.6%) presentaron una tendencia, no estadísticamente significativa ( $p=0.217$ ), a una menor supervivencia global cuando se compararon con los carcinomas no amplificados en base al criterio del ratio  $SISH\ MET/CEP7 \geq 2$ .
7. El análisis de mutaciones en una serie de pacientes diagnosticados de carcinomas de pulmón no microcíticos en estadios iniciales evidenció que:
  - 7.1. Las mutaciones en el gen *BRAF* características de los adenocarcinomas de pulmón no correspondieron al cambio V600E.
  - 7.2. Las mutaciones en los genes *EGFR* (5.9%), *KRAS* (13.7%) y *BRAF* (4.1%) fueron mutuamente excluyentes.
  - 7.3. Las mutaciones en el gen *EGFR* fueron más frecuentes en mujeres no fumadoras mientras que las mutaciones en los genes *KRAS* y *BRAF* fueron más frecuentes en

hombres fumadores. El patrón de mutaciones observado en los genes *KRAS* y *BRAF* confirmó esta asociación ya que se correspondió con cambios de G a T/C, transversiones relacionadas con la exposición a los carcinógenos presentes en el tabaco.

7.4. La presencia de mutaciones en el gen *KRAS* identificó un subgrupo de adenocarcinomas de pulmón con una tendencia, no estadísticamente significativa ( $p=0.46$ ), a presentar un peor pronóstico.

8. La expresión proteica de IGF-1R determinada mediante inmunohistoquímica identificó un subgrupo de carcinomas epidermoides (70%) con una tendencia a presentar un mejor pronóstico, aunque la diferencia en la supervivencia global al comparar carcinomas epidermoides positivos y negativos para la expresión de IGF-1R no fue estadísticamente significativa ( $p=0.14$ ).

9. En la determinación de mutaciones en el gen *EGFR*, el uso de PCR cuantitativa en tiempo real mostró una mayor sensibilidad en comparación con la secuenciación directa del producto de PCR.

10. El uso de anticuerpos específicos para la detección de las dos mutaciones más prevalentes en el gen *EGFR*, la delección E746-A750 en el exón 19 y la mutación puntual L858R en el exón 21, ofreció una especificidad del 100% para el análisis inmunohistoquímico de ambas alteraciones.

## **BIBLIOGRAFÍA**



Agarwal S, Zerillo C, Kolmakova J, Christensen JG, Harris LN, Rimm DL, et al. Association of constitutively activated hepatocyte growth factor receptor (Met) with resistance to a dual EGFR/Her2 inhibitor in non-small-cell lung cancer cells. *Br J Cancer* 2009; 100: 941-949.

Agulló-Ortuño MT, López-Ríos F, Paz-Ares L. Lung cancer genomic signatures. *J Thorac Oncol* 2010; 5: 1673-1691.

Ahrendt SA, Decker PA, Alawi EA, Zhu Yr YR, Sanchez-Cespedes M, Yang SC, et al. Cigarette smoking is strongly associated with mutation of the K-ras gene in patients with primary adenocarcinoma of the lung. *Cancer* 2001; 92: 1525-1530.

Akbari M, Hansen MD, Halgunset J, Skorpen F, Krokan HE. Low copy number DNA template can render polymerase chain reaction error prone in a sequence-dependent manner. *J Mol Diagn* 2005; 7: 36-39.

Allegra CJ, Jessup JM, Somerfield MR, Hamilton SR, Hammond EH, Hayes DF, et al. American Society of Clinical Oncology provisional clinical opinion: testing for KRAS gene mutations in patients with metastatic colorectal carcinoma to predict response to anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibody therapy. *J Clin Oncol* 2009; 27:2091–2096.

Amado RG, Wolf M, Peeters M, Van Cutsem E, Siena S, Freeman DJ, et al. Wild-type KRAS is required for panitumumab efficacy in patients with metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol* 2008; 26:1626–1634.

Amatschek S, Koenig U, Auer H, Steinlein P, Pacher M, Gruenfelder A, et al. Tissue-wide expression profiling using cDNA subtraction and microarrays to identify tumor-specific genes. *Cancer Res* 2004; 64: 844-856.

Ang DC, Ghaffar H, Zakowski MF, Teruya-Feldstein J, Moreira AL, et al. (2010) Expression of squamous markers in lung adenocarcinoma (AD): clinicopathologic and molecular correlates, and implications for differentiation from squamous cell carcinoma (SqCC). Available: [http://www.abstracts2view.com/uscap10/view.php?nu=USCAP10L\\_1770](http://www.abstracts2view.com/uscap10/view.php?nu=USCAP10L_1770).

Angulo B, Suárez-Gauthier A, López-Ríos F, Medina PP, Conde E, Tang M, et al. Expression signatures in lung cancer reveal a profile for EGFR-mutant tumours and identify selective PIK3CA overexpression by gene amplification. *J Pathol*. 2008; 214: 347-356.

Angulo B, García-García E, Martínez R, Suárez-Gauthier A, Conde E, Hidalgo M, et al. A commercial real-time PCR kit provides greater sensitivity than direct sequencing to detect KRAS mutations: a morphology-based approach in colorectal carcinoma. *J Mol Diagn* 2010; 12: 292-299.

Arriagada R, Bergman B, Dunant A, Le Chevalier T, Pignon JP, Vansteenkiste J; International Adjuvant Lung Cancer Trial Collaborative Group. Cisplatin-based adjuvant chemotherapy in patients with completely resected non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med* 2004; 350: 351-360.

Asano H, Toyooka S, Tokumo M, Ichimura K, Aoe K, Ito S, et al. Detection of EGFR gene mutation in lung cancer by mutant-enriched polymerase chain reaction assay. *Clin Cancer Res* 2006; 12: 43-48.

Au NH, Cheang M, Huntsman DG, Yorida E, Coldman A, Elliott WM, et al. Evaluation of immunohistochemical markers in non-small cell lung cancer by unsupervised hierarchical clustering analysis: a tissue microarray study of 284 cases and 18 markers. *J Pathol* 2004; 204: 101-109.

Au NH, Gown AM, Cheang M, Huntsman D, Yorlida E, Elliott WM, et al. P63 expression in lung carcinoma: a tissue microarray study of 408 cases. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* 2004; 12: 240-247.

Azuma K, Okamoto I, Kawahara A, Taira T, Nakashima K, Hattori S, et al. Association of the expression of mutant epidermal growth factor receptor protein as determined with mutation-specific antibodies in non-small cell lung cancer with progression-free survival after gefitinib treatment. *J Thorac Oncol* 2011, doi: 10.1097/JTO.0b013e31822eeba2 [Epub ahead of print]

Bang YJ, Van Cutsem E, Feyereislova A, Chung HC, Shen L, Sawaki A, et al; ToGA Trial Investigators. Trastuzumab in combination with chemotherapy versus chemotherapy alone for treatment of HER2-positive advanced gastric or gastro-oesophageal junction cancer (ToGA): a phase 3, open-label, randomised controlled trial. *Lancet* 2010; 376: 687-697.

Barbie DA, Tamayo P, Boehm JS, Kim SY, Moody SE, Dunn IF, et al. Systematic RNA interference reveals that oncogenic KRAS-driven cancers require TBK1. *Nature* 2009; 462: 108-112.

Bass AJ, Watanabe H, Mermel CH, Yu S, Perner S, Verhaak RG, et al. SOX2 is an amplified lineage-survival oncogene in lung and esophageal squamous cell carcinomas. *Nat Genet* 2009; 41: 1238-1242.

Bean J, Brennan C, Shih JY, Riely G, Viale A, Wang L, et al. MET amplification occurs with or without T790M mutations in EGFR mutant lung tumors with acquired resistance to gefitinib or erlotinib. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007; 104: 20932-20937.

Beau-Faller M, Ruppert AM, Voegeli AC, Neuville A, Meyer N, Guerin E, et al. MET gene copy number in non-small cell lung cancer: molecular analysis in a targeted tyrosine kinase inhibitor naïve cohort. *J Thorac Oncol* 2008; 3: 331-339.

Beer DG, Kardias SL, Huang CC, Giordano TJ, Levin AM, Misek DE, et al. Gene-expression profiles predict survival of patients with lung adenocarcinoma. *Nat Med* 2002; 8: 816-824.

Bepler G, Sharma S, Cantor A, Gautam A, Haura E, Simon G, et al. RRM1 and PTEN as prognostic parameters for overall and disease-free survival in patients with non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol* 2004; 22: 1878-1885.

Berns K, Horlings HM, Hennessy BT, Madiredjo M, Hijmans EM, Beelen K, et al. A functional genetic approach identifies the PI3K pathway as a major determinant of trastuzumab resistance in breast cancer. *Cancer Cell* 2007; 12: 395-402.

Bhattacharjee A, Richards WG, Staunton J, Li C, Monti S, Vasa P, et al. Classification of human lung carcinomas by mRNA expression profiling reveals distinct adenocarcinoma subclasses. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; 98: 13790-13795.

Blank PR, Moch H, Szucs TD, Schwenkglenks M. KRAS and BRAF mutation analysis in metastatic colorectal cancer: a cost-effectiveness analysis from a swiss perspective. *Clin Cancer Res* 2011; 17: 6338-6346.

Blasco RB, Francoz S, Santamaría D, Cañamero M, Dubus P, Charron J, et al. c-Raf, but not B-Raf, is essential for development of K-Ras oncogene-driven non-small cell lung carcinoma. *Cancer Cell* 2011; 19: 652-663.

Boffetta P, Agudo A, Ahrens W, Benhamou E, Benhamou S, Darby SC, et al. Multicenter case-control study of exposure to environmental tobacco smoke and lung cancer in Europe. *J Natl Cancer Inst* 1998; 90: 1440-1450.

Bonnefoi H, Potti A, Delorenzi M, Mauriac L, Campone M, Tubiana-Hulin M, et al. Retraction: Validation of gene signatures that predict the response of breast cancer to neoadjuvant chemotherapy: a substudy of the EORTC 10994/BIG 00-01 clinical trial. *Lancet Oncol* 2011; 12: 116.

Bonner JA, Harari PM, Giralt J, Azarnia N, Shin DM, Cohen RB, et al. Radiotherapy plus cetuximab for squamous-cell carcinoma of the head and neck. *N Engl J Med* 2006; 354: 567-578.

Borcuk AC, Gorenstein L, Walter KL, Assaad AA, Wang L, Powell CA. Non-small-cell lung cancer molecular signatures recapitulate lung developmental pathways. *Am J Pathol* 2003; 163: 1949-1960.

Boyle P, Maisonneuve P. Lung cancer and tobacco smoking. *Lung Cancer* 1995; 12: 167-181.

Brevet M, Arcila M, Ladanyi M. Assessment of EGFR mutation status in lung adenocarcinoma by immunohistochemistry using antibodies specific to the two major forms of mutant EGFR. *J Mol Diagn* 2010; 12: 169-176.

Brose MS, Volpe P, Feldman M, Kumar M, Rishi I, Guerrero R, et al. BRAF and RAS mutations in human lung cancer and melanoma. *Cancer Res* 2002; 62: 6997-7000.

Bunn PA Jr, Helfrich B, Soriano AF, Franklin WA, Varella-Garcia M, Hirsch FR, et al. Expression of Her-2/neu in human lung cancer cell lines by immunohistochemistry and fluorescence in situ hybridization and its relationship to in vitro cytotoxicity by trastuzumab and chemotherapeutic agents. *Clin Cancer Res* 2001; 7: 3239-3250.

Cabanes A, Pérez-Gómez B, Aragonés N, Pollán M, López-Abente G. La situación del cáncer en España: 1995-2006. Madrid: Centro Nacional de Epidemiología. Instituto de Salud Carlos III. Ministerio de Ciencia e Innovación, 2009.

Campbell IG, Russell SE, Choong DY, Montgomery KG, Ciavarella ML, Hooi CS, et al. Mutation of the PIK3CA gene in ovarian and breast cancer. *Cancer Res* 2004; 64: 7678-7681.

Cappuzzo F, Hirsch FR, Rossi E, Bartolini S, Ceresoli GL, Bemis L, et al. Epidermal growth factor receptor gene and protein and gefitinib sensitivity in non-small-cell lung cancer. *J Natl Cancer Inst* 2005; 97: 643-645.

Cappuzzo F, Toschi L, Tallini G, Ceresoli GL, Domenichini I, Bartolini S, et al. Insulin-like growth factor receptor 1 (IGFR-1) is significantly associated with longer survival in non-small-cell lung cancer patients treated with gefitinib. *Ann Oncol* 2006; 17: 1120-1127.

Cappuzzo F, Marchetti A, Skokan M, Rossi E, Gajapathy S, Felicioni L, et al. Increased MET gene copy number negatively affects survival of surgically resected non-small-cell lung cancer patients. *J Clin Oncol* 2009; 27: 1667-1674.

Cappuzzo F, Tallini G, Finocchiaro G, Wilson RS, Ligorio C, Giordano L, et al. Insulin-like growth factor receptor 1 (IGF1R) expression and survival in surgically resected non-small-cell lung cancer (NSCLC) patients. *Ann Oncol* 2010; 21: 562-567.

Carretero J, Medina PP, Pio R, Montuenga LM, Sanchez-Céspedes M. Novel and natural knockout lung cancer cell lines for the LKB1/STK11 tumor suppressor gene. *Oncogene* 2004; 23: 4037-4040.

Carretero J. Carcinógenos y origen del cáncer de pulmón. En: Sánchez-Céspedes M y Rosell R, editores. *Cáncer de pulmón*. Madrid, European School of Oncology, 2005. p. 41-44.

Castillo SD, Angulo B, Suárez-Gauthier A, Melchor L, Medina PP, Sánchez-Verde L, et al. Gene amplification of the transcription factor DP1 and CTNND1 in human lung cancer. *J Pathol* 2010; 222: 89-98.

Chapman PB, Hauschild A, Robert C, Haanen JB, Ascierto P, Larkin J, et al; BRIM-3 Study Group. Improved survival with vemurafenib in melanoma with BRAF V600E mutation. *N Engl J Med* 2011; 364: 2507-2516.

Chen HY, Yu SL, Chen CH, Chang GC, Chen CY, Yuan A, et al. A five-gene signature and clinical outcome in non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med* 2007; 356: 11-20.

Chitale D, Gong Y, Taylor BS, Broderick S, Brennan C, Somwar R, et al. An integrated genomic analysis of lung cancer reveals loss of DUSP4 in EGFR-mutant tumors. *Oncogene* 2009; 28: 2773-2883.

Chitnis MM, Yuen JS, Protheroe AS, Pollak M, Macaulay VM. The type 1 insulin-like growth factor receptor pathway. *Clin Cancer Res* 2008; 14: 6364-6370.

Classon M, Harlow E. The retinoblastoma tumour suppressor in development and cancer. *Nat Rev Cancer* 2002; 2: 910-917.

Coate LE, John T, Tsao MS, Sheperd FA. Molecular predictive and prognostic markers in non-small-cell-lung cancer. *Lancet Oncol* 2009; 10: 1001-1010.

Conde E, Angulo B, Tang M, Morente M, Torres-Lanzas J, López-Encuentra A, et al. Molecular context of the epidermal growth factor receptor mutations: evidence for the activation of mTOR/S6K signaling. *Clin Cancer Res* 2006; 12: 710-717.

Conde E, Angulo B, Redondo P, Toldos O, García-García E, Suárez-Gauthier A, et al. The use of P63 immunohistochemistry for the identification of squamous cell carcinoma of the lung. *PLoS One* 2010; 5: e12209.

Cooper CA, Carby FA, Bubb VJ, Lamb D, Kerr KM, Wyllie AH. The pattern of K-ras mutation in pulmonary adenocarcinoma defines a new pathway of tumour development in the human lung. *J Pathol* 1997; 181: 401-404.

Coyle VM, Johnston PG. Genomic markers for decision making: what is preventing us from using markers? *Nat Rev Clin Oncol* 2010; 7: 90-97.

Dacic S. Lung carcinoma morphology or mutational profile: that is the question. *Arch Pathol Lab Med* 2011; 135: 1242-1243.

Dalton WS and Friend SH. Cancer Biomarkers: an invitation to the table. *Science* 2006; 312: 1165-1168.

D'Angelo SP, Park B, Azzoli CG, Kris MG, Rusch V, Ladanyi M, et al. Reflex testing of resected stage I through III lung adenocarcinomas for EGFR and KRAS mutation: report on initial experience and clinical utility at a single center. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2011; 141: 476-480.



David O, Jett J, LeBeau H, Dy G, Hughes J, Friedman M, et al. Phospho-Akt overexpression in non-small cell lung cancer confers significant stage-independent survival disadvantage. *Clin Cancer Res* 2004; 10: 6865-6871.

Davies H, Bignell GR, Cox C, Stephens P, Edkins S, Clegg S, et al. Mutations of the BRAF gene in human cancer. *Nature* 2002; 417: 949-954.

de Marinis F, Pereira JR, Fossella F, Perry MC, Reck M, Salzberg M, et al. Lung Cancer Symptom Scale outcomes in relation to standard efficacy measures: an analysis of the phase III study of pemetrexed versus docetaxel in advanced non-small cell lung cancer. *J Thorac Oncol* 2008; 3: 30-36.

De Pas T, Toffalorio F, Manzotti M, Fumagalli C, Spitaleri G, Catania C, et al. Activity of Epidermal Growth Factor Receptor-Tyrosine Kinase Inhibitors in Patients with Non-small Cell Lung Cancer Harboring Rare Epidermal Growth Factor Receptor Mutations. *J Thorac Oncol* 2011; 6: 1895-1901.

Dempke WC, Suto T, Reck M. Targeted therapies for non-small cell lung cancer. *Lung Cancer* 2010; 67: 257-274.

DeVita V, Chu E. A History of cancer chemotherapy. *Cancer Res* 2008; 68: 8643-8653.

Di Nicolantonio F, Martini M, Molinari F, Sartore-Bianchi A, Arena S, Saletti P, et al. Wild-type BRAF is required for response to panitumumab or cetuximab in metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol* 2008; 26: 5705-5712.

Ding L, Getz G, Wheeler DA, Mardis ER, McLellan MD, Cibulskis K, et al. Somatic mutations affect key pathways in lung adenocarcinoma. *Nature* 2008; 455: 1069-1075.

Disponibile en URL: <http://www.sanger.ac.uk/genetics/CGP/cosmic/>

Douillard JY, Rosell R, De Lena M, Carpagnano F, Ramlau R, Gonz  les-Larriba JL, et al. Adjuvant vinorelbine plus cisplatin versus observation in patients with completely resected stage IB-IIIa non-small-cell lung cancer (Adjuvant Navelbine International Trialist Association [ANITA]): a randomised controlled trial. *Lancet Oncol* 2006; 7: 719-727.

Druker BJ, Tamura S, Buchdunger E, Ohno S, Segal GM, Fanning S, et al. Effects of a selective inhibitor of the Abl tyrosine kinase on the growth of Bcr-Abl positive cells. *Nat Med* 1996; 2: 561-566.

Duda DG, Ancukiewicz M, Jain RK. Biomarkers of antiangiogenic therapy: how do we move from candidate biomarkers to valid biomarkers? *J Clin Oncol* 2010; 28: 183-185.

Dziedziszko R, Camidge DR, Hirsch FR. The insulin-like growth factor pathway in lung cancer. *J Thorac Oncol* 2008; 3: 815-818.

Dziedziszko R, Merrick DT, Witta SE, Mendoza AD, Szostakiewicz B, Szymanowska A, et al. Insulin-like growth factor receptor 1 (IGF1R) gene copy number is associated with survival in operable non-small-cell lung cancer: a comparison between IGF1R fluorescent in situ hybridization, protein expression, and mRNA expression. *J Clin Oncol* 2010; 28: 2174-2180.

Eberhard DA, Giaccone G, Johnson BE. Biomarkers of response to epidermal growth factor receptor inhibitors in Non-Small-Cell Lung Cancer Working Group: standardization for use in the clinical trial setting. *J Clin Oncol* 2008; 26: 983-994.

Eichhorn PJ, Gili M, Scaltriti M, Serra V, Guzman M, Nijkamp W, et al. Phosphatidylinositol 3-kinase hyperactivation results in lapatinib resistance that is reversed by the mTOR/phosphatidylinositol 3-kinase inhibitor NVP-BEZ235. *Cancer Res* 2008; 68: 9221-9230.

Endo K, Konishi A, Sasaki H, Takada M, Tanaka H, Okumura M, et al. Epidermal growth factor receptor gene mutation in non-small cell lung cancer using highly sensitive and fast TaqMan PCR assay. *Lung Cancer* 2005; 50: 375-384.

Engelman JA, Luo J, Cantley LC. The evolution of phosphatidylinositol 3-kinases as regulators of growth and metabolism. *Nat Rev Genet* 2006; 7: 606-619.

Engelman JA, Zejnullahu K, Mitsudomi T, Song Y, Hyland C, Park JO, et al. MET amplification leads to gefitinib resistance in lung cancer by activating ERBB3 signaling. *Science* 2007; 316: 1039-1043.

Engelman JA, Zejnullahu K, Gale CM, Lifshits E, Gonzales AJ, Shimamura T, et al. PF00299804, an irreversible pan-ERBB inhibitor, is effective in lung cancer models with EGFR and ERBB2 mutations that are resistant to gefitinib. *Cancer Res* 2007; 67: 11924-11932.

Engelman JA. The role of phosphoinositide 3-kinase pathway inhibitors in the treatment of lung cancer. *Clin Cancer Res* 2007; 13: s4637-s4640.

Engelman JA, Chen L, Tan X, Crosby K, Guimaraes AR, Upadhyay R, et al. Effective use of PI3K and MEK inhibitors to treat mutant Kras G12D and PIK3CA H1047R murine lung cancers. *Nat Med* 2008; 14:1351-1356.

Engelman JA, Jänne PA. Mechanisms of acquired resistance to epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitors in non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res* 2008; 14: 2895-2899.

Farray D, Mirkovic N, Albain KS. Multimodality therapy for stage III non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol* 2005; 23: 3257-3269.

Fernández P, Carretero J, Medina PP, Jiménez AI, Rodríguez-Perales S, Paz MF, et al. Distinctive gene expression of human lung adenocarcinomas carrying LKB1 mutations. *Oncogene* 2004; 23: 5084-5091.

Flaherty KT, Puzanov I, Kim KB, Ribas A, McArthur GA, Sosman JA, et al. Inhibition of mutated, activated BRAF in metastatic melanoma. *N Engl J Med* 2010; 363: 809-819.

Franco J. Epidemiología del cáncer de pulmón. En: Sánchez-Céspedes M y Rosell R, editores. *Cáncer de pulmón*. Madrid, European School of Oncology, 2005. p. 17-22.

Frattini M, Saletti P, Romagnani E, Martin V, Molinari F, Ghisletta M, et al. PTEN loss of expression predicts cetuximab efficacy in metastatic colorectal cancer patients. *Br J Cancer* 2007; 97: 1139-1145.

Garber ME, Troyanskaya OG, Schluens K, Petersen S, Thaessler Z, Pacyna-Gengelbach M, et al. Diversity of gene expression in adenocarcinoma of the lung. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; 98: 13784-13789.

García-García E, Gómez-Martín C, Angulo B, Conde E, Suárez-Gauthier A, Adrados M, et al. Hybridization for human epidermal growth factor receptor 2 testing in gastric carcinoma: a comparison of fluorescence in-situ hybridization with a novel fully automated dual-colour silver in-situ hybridization method. *Histopathology* 2011; 59: 8-17.

García-Rostán G, Costa AM, Pereira-Castro I, Salvatore G, Hernandez R, Hermsem MJ, et al. Mutation of the PIK3CA gene in anaplastic thyroid cancer. *Cancer Res* 2005; 65: 10199-10207.

Garnett MJ, Marais R. Guilty as charged: B-Raf is a human oncogene. *Cancer Cell* 2004; 6: 313-319.

Go H, Jeon YK, Park HJ, Sung SW, Seo JW, Chung DH. High MET gene copy number leads to shorter survival in patients with non-small cell lung cancer. *J Thorac Oncol* 2010; 5: 305-313.

Gong Y, Yao E, Shen R, Goel A, Arcila M, Teruya-Feldstein J, et al. High expression levels of total IGF-1R and sensitivity of NSCLC cells in vitro to an anti-IGF-1R antibody (R1507). *PLoS One* 2009; 4: e7273.

Govindan R. INTERESTing biomarker to select IDEAL patients for epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitors: yes, for EGFR mutation analysis, others, I PASS. *J Clin Oncol* 2010; 28: 713-715.

Greshock J, Naylor TL, Margolin A, Diskin S, Cleaver SH, Futreal PA, et al. 1-Mb resolution array-based comparative genomic hybridization using a BAC clone set optimized for cancer gene analysis. *Genome Res* 2004; 14: 179-187.

Gualberto A, Pollak M. Emerging role of insulin-like growth factor receptor inhibitors in oncology: early clinical trial results and future directions. *Oncogene* 2009; 28: 3009-3021.

Gualberto A, Dolled-Filhart M, Gustavson M, Christiansen J, Wang YF, Hixon ML, et al. Molecular analysis of non-small cell lung cancer identifies subsets with different sensitivity to insulin-like growth factor I receptor inhibition. *Clin Cancer Res* 2010; 16: 4654-4665.

Guix M, Faber AC, Wang SE, Olivares MG, Song Y, Qu S, Rinehart C, et al. Acquired resistance to EGFR tyrosine kinase inhibitors in cancer cells is mediated by loss of IGF-binding proteins. *J Clin Invest* 2008; 118: 2609-2619.

Hainaut P, Pfeifer GP. Patterns of p53 G → T transversions in lung cancers reflect the primary mutagenic signature of DNA-damage by tobacco smoke. *Carcinogenesis*. 2001; 22: 367-374.

Hait WN. Targeted cancer therapeutics. *Cancer Res* 2009; 64: 1263-1267.

Halilovic E, Solit DB. Therapeutic strategies for inhibiting oncogenic BRAF signaling. *Curr Opin Pharmacol* 2008; 8: 419-426.

Halilovic E, She QB, Ye Q, Pagliarini R, Sellers WR, Solit DB, et al. PIK3CA mutation uncouples tumor growth and cyclin D1 regulation from MEK/ERK and mutant KRAS signaling. *Cancer Res* 2010; 70: 6804-6814.

Hammerman PS, Sos ML, Ramas AH, Xu C, Dutt A, Zhou W, et al. Mutations in the DDR2 kinase gene identify a novel therapeutic target in squamous cell lung cancer. *Cancer Discovery* 2011; 1: 78-89.

Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell* 2000; 100: 57-70.

Hayes DN, Monti S, Parmigiani G, Gilks CB, Naoki K, Bhattacharjee A, et al. Gene expression profiling reveals reproducible human lung adenocarcinoma subtypes in multiple independent patient cohorts. *J Clin Oncol* 2006; 24: 5079-5090.

Heinrich MC, Owzar K, Corless CL, Hollis D, Borden EC, Fletcher CD, et al. Correlation of kinase genotype and clinical outcome in the North American Intergroup Phase III Trial of imatinib mesylate for treatment of advanced gastrointestinal stromal tumor: CALGB 150105 Study by Cancer and Leukemia Group B and Southwest Oncology Group. *J Clin Oncol* 2008; 26: 5360-5367.

Herbst RS, Lippman SM. Molecular signatures of lung cancer-toward personalized therapy. *N Engl J Med* 2007; 356: 76-78.

Herrero J, Al-Shahrour F, Díaz-Uriarte R, Mateos A, Vaquerizas JM, Santoyo J, et al. GEPAS: A web-based resource for microarray gene expression data analysis. *Nucleic Acids Res* 2003; 31: 3461-3467.

Hirsch FR, Varella-Garcia M, Bunn PA Jr, Franklin WA, Dziadziuszko R, Thatcher N, et al. Molecular predictors of outcome with gefitinib in a phase III placebo-controlled study in advanced non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol* 2006; 24: 5034-5042.

Hirsch FR, Spreafico A, Novello S, Wood MD, Simms L, Papotti M. The prognostic and predictive role of histology in advanced non-small cell lung cancer: a literature review. *J Thorac Oncol* 2008; 3: 1468-1481.

Hirsch FR, Bunn PA Jr. EGFR testing in lung cancer is ready for prime time. *Lancet Oncol* 2009; 10: 432-433.

Holbro T, Civenni G and Hynes NE. The ErbB receptors and their role in cancer progression. *Exp Cell Res* 2003; 284: 99-110.

Hou J, Aerts J, den Hamer B, van Ijcken W, den Bakker M, Riegman P, et al. Gene expression-based classification of non-small cell lung carcinomas and survival prediction. *PLoS One* 2010; 5: e10312.

Hsu DS, Balakumaran BS, Acharya CR, Vlahovic V, Walters KS, Garman K, et al. Retraction. Pharmacogenomic strategies provide a rational approach to the treatment of cisplatin-resistant patients with advanced cancer. *J Clin Oncol* 25: 4350-7, 2007. *J Clin Oncol* 2010; 28: 5229.

Janku F, Stewart DJ, Kurzrock R. Targeted therapy in non-small-cell lung cancer--is it becoming a reality? *Nat Rev Clin Oncol* 2010; 7: 401-414.

Janku F, Garrido-Laguna I, Petruzelka LB, Stewart DJ, Kurzrock R. Novel therapeutic targets in non-small cell lung cancer. *J Thorac Oncol* 2011; 6: 1601-1612.

Janku F, Tsimberidou AM, Garrido-Laguna I, Wang X, Luthra R, Hong DS, et al. PIK3CA mutations in patients with advanced cancers treated with PI3K/AKT/mTOR axis inhibitors. *Mol Cancer Ther* 2011; 10: 558-565.

Jemal A, Siegel R, Xu J, Ward E. Cancer statistics, 2010. *CA Cancer J Clin* 2010; 60: 277-300.

Jiang SX, Yamashita K, Yamamoto M, Piao CJ, Umezawa A, Saegusa M, et al. EGFR genetic heterogeneity of nonsmall cell lung cancers contributing to acquired gefitinib resistance. *Int J Cancer* 2008; 123: 2480-2486.

Jimeno A, Messersmith WA, Hirsch FR, Franklin WA, Eckhardt SG. KRAS mutations and sensitivity to epidermal growth factor receptor inhibitors in colorectal cancer: practical application of patient selection. *J Clin Oncol* 2009; 27: 1130-1136.

Johnson BE, Jänne PA. Selecting patients for epidermal growth factor receptor inhibitor treatment: A FISH story or a tale of mutations? *J Clin Oncol* 2005; 23: 6813-6816.

Karamouzis MV, Konstantinopoulos PA, Papavassiliou AG. Targeting MET as a strategy to overcome crosstalk-related resistance to EGFR inhibitors. *Lancet Oncol* 2009; 10: 709-717.

Kargi A, Gurel D, Tuna B. The diagnostic value of TTF-1, CK 5/6, and p63 immunostaining in classification of lung carcinomas. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* 2007; 15: 415-420.

Karp DD, Paz-Ares LG, Novello S, Haluska P, Garland L, Cardenal F, et al. Phase II study of the anti-insulin-like growth factor type 1 receptor antibody CP-751,871 in combination with paclitaxel and carboplatin in previously untreated, locally advanced, or metastatic non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol* 2009; 27: 2516-2522.

Kato Y, Peled N, Wynes MW, Yoshida K, Pardo M, Mascaux C, et al. Novel epidermal growth factor receptor mutation-specific antibodies for non-small cell lung cancer: immunohistochemistry as a possible screening method for epidermal growth factor receptor mutations. *J Thorac Oncol* 2010; 5: 1551-1558.

Kaufmann O, Fietze E, Mengs J, Dietel M. Value of p63 and cytokeratin 5/6 as immunohistochemical markers for the differential diagnosis of poorly differentiated and undifferentiated carcinomas. *Am J Clin Pathol* 2001; 116: 823-830.

Kawahara A, Yamamoto C, Nakashima K, Azuma K, Hattori S, Kashihara M, et al. Molecular diagnosis of activating EGFR mutations in non-small cell lung cancer using mutation specific antibodies for immunohistochemical analysis. *Clin Cancer Res* 2010; 16: 3163-3170.

Kawano O, Sasaki H, Endo K, Suzuki E, Haneda H, Yukiue H, et al. PIK3CA mutation status in Japanese lung cancer patients. *Lung Cancer* 2006; 54: 209-215.

Kawano O, Sasaki H, Okuda K, Yukiue H, Yokoyama T, Yano M, Fujii Y. PIK3CA gene amplification in Japanese non-small cell lung cancer. *Lung Cancer* 2007; 58: 159-160.

Kelley MJ, Nakagawa K, Steinberg SM, Mulshine JL, Kamb A, Johnson BE. Differential inactivation of CDKN2 and Rb protein in non-small-cell and small-cell lung cancer cell lines. *J Natl Cancer Inst* 1995; 87: 756-761.

Khambata-Ford S, Garrett CR, Meropol NJ, Basik M, Harbison CT, Wu S, et al. Expression of epiregulin and amphiregulin and K-ras mutation status predict disease control in metastatic colorectal cancer patients treated with cetuximab. *J Clin Oncol* 2007; 25: 3230-3237.

Khambata-Ford S, Harbison CT, Hart LL, Awad M, Xu LA, Horak CE, et al. Analysis of potential predictive markers of cetuximab benefit in BMS099, a phase III study of cetuximab and first-line taxane/carboplatin in advanced non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol*. 2010; 28: 918-927.

Kikuchi T, Daigo Y, Katagiri T, Tsunoda T, Okada K, Kakiuchi S, et al. Expression profiles of non-small cell lung cancers on cDNA microarrays: identification of genes for prediction of lymph-node metastasis and sensitivity to anti-cancer drugs. *Oncogene* 2003; 22: 2192-2205.

Kim TM, Yim SH, Lee JS, Kwon MS, Ryu JW, Kang HM, et al. Genome-wide screening of genomic alterations and their clinicopathologic implications in non-small cell lung cancers. *Clin Cancer Res* 2005; 11: 8235-8242.

Kim DH, Kwon MS. Role of fine needle aspiration cytology, cell block preparation and CD63, P63 and CD56 immunostaining in classifying the specific tumor type of the lung. *Acta Cytol* 2010; 54: 55-59.

Kim ES, Herbst RS, Wistuba II, Lee JJ, Blumenschein GR, Tsao A, et al. The BATTLE trial: personalizing therapy for lung cancer. *Cancer Discovery* 2011; 1: 44-53

Kimura H, Fujiwara Y, Sone T, Kunitoh H, Tamura T, Kasahara K, et al. High sensitivity detection of epidermal growth factor receptor mutations in the pleural effusion of non-small cell lung cancer patients. *Cancer Sci* 2006; 97: 642-648.

Kimura H, Kasahara K, Kawaishi M, Kunitoh H, Tamura T, Holloway B, et al. Detection of epidermal growth factor receptor mutations in serum as a predictor of the response to gefitinib in patients with non-small-cell lung cancer. *Clin Cancer Res* 2006; 12: 3915-3921.

Kitamura A, Hosoda W, Sasaki E, Mitsudomi T, Yatabe Y. Immunohistochemical detection of EGFR mutation using mutation-specific antibodies in lung cancer. *Clin Cancer Res* 2010; 16: 3349-3355.

Knight ZA, Lin H, Shokat KM. Targeting the cancer kinome through polypharmacology. *Nat Rev Cancer* 2010; 10: 130-137.

Kosaka T, Yatabe Y, Endoh H, Kuwano H, Takahashi T, Mitsudomi T. Mutations of the epidermal growth factor receptor gene in lung cancer: biological and clinical implications. *Cancer Res* 2004; 64: 8919-8923.

Kosaka T, Yatabe Y, Onozato R, Kuwano H, Mitsudomi T. Prognostic implication of EGFR, KRAS, and TP53 gene mutations in a large cohort of Japanese patients with surgically treated lung adenocarcinoma. *J Thorac Oncol* 2009; 4: 22-29.

Kwak EL, Sordella R, Bell DW, Godin-Heymann N, Okimoto RA, Brannigan BW, et al. Irreversible inhibitors of the EGF receptor may circumvent acquired resistance to gefitinib. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005; 102: 7665-7670.

Kwak EL, Bang YJ, Camidge DR, Shaw AT, Solomon B, Maki RG, et al. Anaplastic lymphoma kinase inhibition in non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med* 2010; 363: 1693-1703.

Ladanyi M. Targeted therapy of cancer: new roles for pathologists. *Modern Pathology* 2008; 21: S1.

Lamy PJ, Montels F, Servanton AC, Ychou M, Crapez E. Diagnostic of KRAS gene mutations in colorectal cancer: evaluation of direct sequencing, pyrosequencing and allele specific amplification. ECCO15 and 34th ESMO Multidisciplinary Congress, September 20-24, 2009. Abstract #1322.

Langer CJ, Besse B, Gualberto A, Brambilla E, Soria JC. The evolving role of histology in the management of advanced non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol* 2010; 28: 5311-5320.

Lebanony D, Benjamin H, Gilad S, Ezagouri M, Dov A, Ashkenazi K, et al. Diagnostic assay based on hsa-miR-205 expression distinguishes squamous from non-squamous non-small-cell lung carcinoma. *J Clin Oncol* 2009; 27: 2030-2037.

Leonard D. Molecular pathology in clinical practice: infectious diseases. Edited by D Leonard. New York, Springer Science, 2009.

Leonard D. Molecular pathology in clinical practice: genetics. Edited by D. Leonard. New York, Springer Science, 2009.

Leonard D. Molecular pathology in clinical practice: oncology. Edited by D. Leonard. New York, Springer Science, 2009.

Levine DA, Bogomolny F, Yee CJ, Lash A, Barakat RR, Borgen PI, et al. Frequent mutation of the PIK3CA gene in ovarian and breast cancers. *Clin Cancer Res* 2005; 11: 2875-2878.

Li J, Wang L, Mamon H, Kulke MH, Berbeco R, Makrigiorgos GM. Replacing PCR with COLD-PCR enriches variant DNA sequences and redefines the sensitivity of genetic testing. *Nat Med* 2008; 14: 579-584.

Li D, Ambrogio L, Shimamura T, Kubo S, Takahashi M, Chirieac LR, et al. BIBW2992, an irreversible EGFR/HER2 inhibitor highly effective in preclinical lung cancer models. *Oncogene* 2008; 27: 4702-4711.

Lièvre A, Bachet JB, Le Corre D, Boige V, Landi B, Emile JF, et al. KRAS mutation status is predictive of response to cetuximab therapy in colorectal cancer. *Cancer Res* 2006; 66: 3992-3995.

Lièvre A, Bachet JB, Boige V, Cayre A, Le Corre D, Buc E, et al. KRAS mutations as an independent prognostic factor in patients with advanced colorectal cancer treated with cetuximab. *J Clin Oncol* 2008; 26: 374-379.

Liu Y, Borchert GL, Surazynski A, Hu CA, Phang JM. Proline oxidase activates both intrinsic and extrinsic pathways for apoptosis: the role of ROS/superoxides, NFAT and MEK/ERK signaling. *Oncogene* 2006; 25: 5640-5647.

Lockwood WW, Chari R, Coe BP, Girard L, Macaulay C, Lam S, et al. DNA amplification is a ubiquitous mechanism of oncogene activation in lung and other cancers. *Oncogene* 2008; 27: 4615-4624.

Loo PS, Thomas SC, Nicolson MC, Fyfe MN, Kerr KM. Subtyping of undifferentiated non-small cell carcinomas in bronchial biopsy specimens. *J Thorac Oncol* 2010; 5: 442-447.

Ludovini V, Bellezza G, Pistola L, Bianconi F, Di Carlo L, Sidoni A, et al. High coexpression of both insulin-like growth factor receptor-1 (IGFR-1) and epidermal growth factor receptor (EGFR) is associated with shorter disease-free survival in resected non-small-cell lung cancer patients. *Ann Oncol* 2009; 20: 842-849.

Ludovini V, Bianconi F, Pistola L, Chiari R, Minotti V, Colella R, et al. Phosphoinositide-3-kinase catalytic alpha and KRAS mutations are important predictors of resistance to therapy with epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitors in patients with advanced non-small cell lung cancer. *J Thorac Oncol* 2011; 6: 707-715.

Lynch TJ, Bell DW, Sordella R, Gurubhagavatula S, Okimoto RA, Brannigan BW, et al. Activating mutations in the epidermal growth factor receptor underlying responsiveness of nonsmall-cell lung cancer to gefitinib. *N Engl J Med* 2004; 350: 2129-2139.

Maheswaran S, Sequist LV, Nagrath S, Ulkus L, Brannigan B, Collura CV, et al. Detection of mutations in EGFR in circulating lung-cancer cells. *N Engl J Med* 2008; 359: 366-377.

Malumbres M, Barbacid M. RAS oncogenes: the first 30 years. *Nat Rev Cancer* 2003; 3: 459-465.

Marchetti A, Felicioni L, Buttitta F. Assessing EGFR mutations. *N Engl J Med* 2006; 354: 526-528.

Markman B, Atzori F, Pérez-García J, Tabernero J, Baselga J. Status of PI3K inhibition and biomarker development in cancer therapeutics. *Ann Oncol* 2010; 21: 683-691.

Massion PP, Kuo WL, Stokoe D, Olshen AB, Treseler PA, Chin K, et al. Genomic copy number analysis of non-small cell lung cancer using array comparative genomic hybridization: implications of the phosphatidylinositol 3-kinase pathway. *Cancer Res* 2002; 62: 3636–3640.

Massion PP, Taflan PM, Jamshedur Rahman SM, Yildiz P, Shyr Y, et al. Significance of p63 amplification and overexpression in lung cancer development and prognosis. *Cancer Res* 2003; 63: 7113-7121.

McDermott U, Sharma SV, Dowell L, Greninger P, Montagut C, Lamb J, et al. Identification of genotype-correlated sensitivity to selective kinase inhibitors by using high-throughput tumor cell line profiling. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007; 104:19936-19941.

Medina PP, Castillo SD, Blanco S, Sanz-García M, Largo C, Álvarez S, et al. The SRY-HMG box gene, SOX4, is a target of gene amplification at chromosome 6p in lung cancer. *Hum Mol Genet* 2009; 18: 1343-1352.

Mendelsohn J, Tursz T, Schilsky RL, Lazar V. WIN Consortium-challenges and advances. *Nat Rev Clin Oncol* 2011; 8: 133-134.

Meyerson M, Carbone D. Genomic and proteomic profiling of lung cancers: lung cancer classification in the age of targeted therapy. *J Clin Oncol* 2005; 23: 3219-3226.

Mitsudomi T, Kosaka T, Endoh H, Horio Y, Hida T, Mori S, et al. Mutations of the epidermal growth factor receptor gene predict prolonged survival after gefitinib treatment in patients with non-small-cell lung cancer with postoperative recurrence. *J Clin Oncol* 2005; 24: 2513-2520.

Mitsudomi T, Morita S, Yatabe Y, Negoro S, Okamoto I, Tsurutani J, et al. Gefitinib versus cisplatin plus docetaxel in patients with non-small-cell lung cancer harbouring mutations of the epidermal growth factor receptor (WJTOG3405): an open label, randomised phase 3 trial. *Lancet Oncol* 2010; 11: 121-128.

Miyamae Y, Shimizu K, Mitani Y, Araki T, Kawai Y, Baba M, et al. Mutation detection of epidermal growth factor receptor and KRAS genes using the smart amplification process version 2 from formalin-fixed, paraffin-embedded lung cancer tissue. *J Mol Diagn* 2010; 12: 257-264.

Mok TS, Wu YL, Thongprasert S, Yang CH, Chu DT, Saijo N, et al. Gefitinib or carboplatin-paclitaxel in pulmonary adenocarcinoma. *N Engl J Med* 2009; 361: 947-957.

Mok TS. Personalized medicine in lung cancer: what we need to know. *Nat Rev Clin Oncol* 2011, doi: 10.1038/nrclinonc.2011.126. [Epub ahead of print]

Monica V, Ceppi P, Righi L, Tavaglione V, Volante M, Pelosi G, et al. Desmocollin-3: a new marker of squamous differentiation in undifferentiated large-cell carcinoma of the lung. *Mod Pathol* 2009; 22: 709-717.

Murray N, Turrisi AT. A review of first-line treatment for small-cell lung cancer. *J Thorac Oncology* 2006; 1: 270-278.



- Nacht M, Dracheva T, Gao Y, Fujii T, Chen Y, Player A, et al. Molecular characteristics of non-small cell lung cancer. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; 98: 15203-15208.
- Nagata Y, Lan KH, Zhou X, Tan M, Esteva FJ, Sahin AA, et al. PTEN activation contributes to tumor inhibition by trastuzumab, and loss of PTEN predicts trastuzumab resistance in patients. *Cancer Cell* 2004; 6: 117-127.
- Nakamura N, Kobayashi K, Nakamoto M, Kohno T, Sasaki H, Matsuno Y, et al. Identification of tumor markers and differentiation markers for molecular diagnosis of lung adenocarcinoma. *Oncogene* 2006; 25: 4245-4255.
- Nicholson AG, Gonzalez D, Shah P, Pynegar MJ, Deshmukh M, Rice A, et al. Refining the diagnosis and EGFR status of non-small cell lung carcinoma in biopsy and cytologic material, using a panel of mucin staining, TTF-1, cytokeratin 5/6, and P63, and EGFR mutation analysis. *J Thorac Oncol* 2010; 5: 436-441.
- Newton CR, Graham A, Heptinstall LE, Powell SJ, Summers C, Kalsheker N, et al. Analysis of any point mutation in DNA. The amplification refractory mutation system (ARMS). *Nucleic Acids Res* 1989; 17: 2503-2516.
- O'Byrne KJ, Gatzemeier U, Bondarenko I, Barrios C, Eschbach C, Martens UM, et al. Molecular biomarkers in non-small-cell lung cancer: a retrospective analysis of data from the phase 3 FLEX study. *Lancet Oncol* 2011; 12: 795-805.
- Ohashi K, Pao W. A new target for therapy in squamous cell carcinoma of the lung. *Cancer Discovery* 2011; 1: 23-24.
- Okudela K, Suzuki M, Kageyama S, Bunai T, Nagura K, Igarashi H, et al. PIK3CA mutation and amplification in human lung cancer. *Pathol Int* 2007; 57: 664-671.
- Olaussen KA, Dunant A, Fouret P, Brambilla E, André F, Haddad V, et al. DNA repair by ERCC1 in non-small-cell lung cancer and cisplatin-based adjuvant chemotherapy. *N Engl J Med* 2006; 355: 983-991.
- Onitsuka T, Uramoto H, Ono K, Takenoyama M, Hanagiri T, Oyama T, et al. Comprehensive molecular analyses of lung adenocarcinoma with regard to the epidermal growth factor receptor, K-ras, MET, and hepatocyte growth factor status. *J Thorac Oncol* 2010; 5: 591-596.
- Onozato R, Kosaka T, Kuwano H, Sekido Y, Yatabe Y, Mitsudomi T. Activation of MET by gene amplification or by splice mutations deleting the juxtamembrane domain in primary resected lung cancers. *J Thorac Oncol* 2009; 4: 5-11.
- Ou SH, Kwak EL, Siwak-Tapp C, Dy J, Bergethon K, Clark JW, et al. Activity of crizotinib (PF02341066), a dual mesenchymal-epithelial transition (MET) and anaplastic lymphoma kinase (ALK) inhibitor, in a non-small cell lung cancer patient with de novo MET amplification. *J Thorac Oncol* 2011; 6: 942-946.
- Paez JG, Jänne PA, Lee JC, Tracy S, Greulich H, Gabriel S, et al. EGFR mutations in lung cancer: correlation with clinical response to gefitinib therapy. *Science* 2004; 304: 1497-1500.
- Packenham JP, Taylor JA, White CM, Anna CH, Barrett JC, Devereux TR. Homozygous deletions at chromosome 9p21 and mutation analysis of p16 and p15 in microdissected primary non-small cell lung cancers. *Clin Cancer Res* 1995; 1: 687-690.

Paik PK, Arcila ME, Fara M, Sima CS, Miller VA, Kris MG, et al. Clinical characteristics of patients with lung adenocarcinomas harboring BRAF mutations. *J Clin Oncol* 2011; 29: 2046-2051.

Pan Q, Pao W, Ladanyi M. Rapid polymerase chain reaction-based detection of epidermal growth factor receptor gene mutations in lung adenocarcinomas. *J Mol Diagn* 2005; 7: 396-403.

Pao W, Miller V, Zakowski M, Doherty J, Politi K, Sarkaria I, et al. EGF receptor gene mutations are common in lung cancers from "never smokers" and are associated with sensitivity of tumors to gefitinib and erlotinib. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004; 101: 13306-13311.

Pao W, Ladanyi M. Epidermal growth factor receptor mutation testing in lung cancer: searching for the ideal method. *Clin Cancer Res* 2007; 13: 4954-4955.

Pao W, Kris MG, Iafrate AJ, Ladanyi M, Jänne PA, Wistuba II, et al. Integration of molecular profiling into the lung cancer clinic. *Clin Cancer Res* 2009; 15: 5317-5322.

Pao W, Iafrate AJ, Su Z. Genetically informed lung cancer medicine. *J Pathol* 2011; 223: 230-240.

Pao W, Girard N. New driver mutations in non-small-cell lung cancer. *Lancet Oncol* 2011; 12: 175-180.

Pardo J, Martínez-Peñuela AM, Sola JJ, Panizo A, Gúrpide A, Martínez-Peñuela JM, et al. Large cell carcinoma of the lung: an endangered species? *Appl Immunohistochem Mol Morphol* 2009; 17: 383-392.

Parmigiani G, Garrett-Mayer ES, Anbazhagan R, Gabrielson E. A cross-study comparison of gene expression studies for the molecular classification of lung cancer. *Clin Cancer Res* 2004; 10: 2922-2927.

Pelosi G, Pasini F, Olsen Stenholm C, Pastorino U, Maisonneuve P, Sonzogni A, et al. p63 immunoreactivity in lung cancer: yet another player in the development of squamous cell carcinomas? *J Pathol* 2002; 198: 100-109.

Pérez-Soler R. Individualized therapy in non-small-lung cancer: future versus current clinical practice. *Oncogene* 2009; 28: 538-545.

Perou CM, Sørli T, Eisen MB, van de Rijn M, Jeffrey SS, Rees CA, et al. Molecular portraits of human breast tumours. *Nature* 2000; 406: 747-752.

Peruzzi B, Bottaro DP. Targeting the c-Met signaling pathway in cancer. *Clin Cancer Res* 2006; 12: 3657-3660.

Phillips WA, Russell SE, Ciavarella ML, Choong DY, Montgomery KG, Smith K, et al. Mutation analysis of PIK3CA and PIK3CB in esophageal cancer and Barrett's esophagus. *Int J Cancer* 2006; 118: 2644-2646.

Pinkel D, Segraves R, Sudar D, Clark S, Poole I, Kowbel D, et al. High resolution analysis of DNA copy number variation using comparative genomic hybridization to microarrays. *Nat Genet* 1998; 20: 207-211.

Pirker R, Pereira JR, Szczesna A, von Pawel J, Krzakowski M, Ramlau R, et al. Cetuximab plus chemotherapy in patients with advanced non-small-cell lung cancer (FLEX): an open-label randomised phase III trial. *Lancet* 2009; 373: 1525-1531.

- Pirker R, Herth FJ, Kerr KM, Filipits M, Taron M, Gandara D, et al. Consensus for EGFR mutation testing in non-small cell lung cancer: results from a European workshop. *J Thorac Oncol* 2010; 5: 1706-1713.
- Pisters KM, Le Chevalier T. Adjuvant chemotherapy in completely resected non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol* 2005; 23: 3270-3278.
- Pollack JR, Perou CM, Alizadeh AA, Eisen MB, Pergamenschikov A, Williams CF, et al. Genome-wide analysis of DNA copy-number changes using cDNA microarrays. *Nat Genet* 1999; 23: 41-46.
- Pollak M. Insulin and insulin-like growth factor signalling in neoplasia. *Nat Rev Cancer* 2008; 8: 915-928.
- Potti A, Mukherjee S, Petersen R, Dressman HK, Bild A, Koontz J, et al. Retraction: A genomic strategy to refine prognosis in early-stage non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med* 2006; 355: 570-80. *N Engl J Med* 2011; 364: 1176.
- Potti A, Dressman HK, Bild A, Riedel RF, Chan G, Sayer R, et al. Retraction: Genomic signatures to guide the use of chemotherapeutics. *Nat Med* 2011; 17: 135.
- Puyol M, Martín A, Dubus P, Mulero F, Pizcueta P, Khan G, et al. A synthetic lethal interaction between K-Ras oncogenes and Cdk4 unveils a therapeutic strategy for non-small cell lung carcinoma. *Cancer Cell* 2010; 18: 63-73.
- Qian HR, Huang S. Comparison of false discovery rate methods in identifying genes with differential expression. *Genomics* 2005; 86: 495-503.
- Qiu W, Schönleben F, Li X, Ho DJ, Close LG, Manolidis S, et al. PIK3CA mutations in head and neck squamous cell carcinoma. *Clin Cancer Res* 2006; 12: 1441-1446.
- Quinlan DC, Davidson AG, Summers CL, Warden HE, Doshi HM. Accumulation of p53 protein correlates with a poor prognosis in human lung cancer. *Cancer Res* 1992; 52: 4828-4831.
- Raguz S, Yagüe E. Resistance to chemotherapy: new treatments and novel insights into and old problem. *Br J Cancer* 2008; 99: 387-391.
- Ramalingam SS, Spigel DR, Chen D, Steins MB, Engelman JA, Schneider CP, et al. Randomized Phase II Study of Erlotinib in Combination With Placebo or R1507, a Monoclonal Antibody to Insulin-Like Growth Factor-1 Receptor, for Advanced-Stage Non-Small-Cell Lung Cancer. *J Clin Oncol* 2011, doi: 10.1200/JCO.2011.36.6799 [Epub ahead of print].
- Richardson GE, Johnson BE. The biology of lung cancer. *Semin Oncol* 1993; 20: 105-127.
- Riely GJ, Pao W, Pham D, Li AR, Rizvi N, Venkatraman ES, et al. Clinical course of patients with non-small cell lung cancer and epidermal growth factor receptor exon 19 and exon 21 mutations treated with gefitinib or erlotinib. *Clin Cancer Res* 2006; 12: 839-844.
- Riely GJ, Kris MG, Rosenbaum D, Marks J, Li A, Chitale DA, et al. Frequency and distinctive spectrum of KRAS mutations in never smokers with lung adenocarcinoma. *Clin Cancer Res* 2008; 14: 5731-5734.
- Ring BZ, Seitz RS, Beck RA, Shasteen WJ, Soltermann A, Arbogast S, et al. A novel five-antibody immunohistochemical test for subclassification of lung carcinoma. *Mod Pathol* 2009; 22: 1032-1043.

Roberts PJ, Stinchcombe TE, Der CJ, Socinski MA. Personalized medicine in non-small-cell lung cancer: is KRAS a useful marker in selecting patients for epidermal growth factor receptor-targeted therapy? *J Clin Oncol* 2010; 28: 4769-4777.

Rodig SJ, Mino-Kenudson M, Dacic S, Yeap BY, Shaw A, Barletta JA, et al. Unique clinicopathologic features characterize ALK-rearranged lung adenocarcinoma in the western population. *Clin Cancer Res* 2009; 15: 5216-5223.

Rosell R, Danenberg KD, Alberola V, Bepler G, Sanchez JJ, Camps C, et al. Ribonucleotide reductase messenger RNA expression and survival in gemcitabine/cisplatin-treated advanced non-small cell lung cancer patients. *Clin Cancer Res* 2004; 10: 1318-1325.

Rosell R, Moran T, Queralt C, Porta R, Cardenal F, Camps C, et al. Screening for epidermal growth factor receptor mutations in lung cancer. *N Engl J Med* 2009; 361: 958-967.

Rosell R, Gervais R, Vergnenegre A, Massuti B, Felip E, Cardenal F, et al. Erlotinib versus chemotherapy in advanced non-small cell lung cancer patients with epidermal growth factor receptor mutations: Interim results of the European Erlotinib vs chemotherapy (EURTAC) phase III renandomized trial (abstract). *J Clin Oncol* 2011; 29 (suppl): a7503.

Roses AD. Pharmacogenetics in drug discovery and development: a translational perspective. *Nat Rev Drug Discov* 2008; 7: 807-817.

Rossi G, Papotti M, Barbareschi M, Graziano P, Pelosi G. Morphology and a limited number of immunohistochemical markers may efficiently subtype non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol* 2009; 27: e141-e142.

Rubin BP, Singer S, Tsao C, Duensing A, Lux ML, Ruiz R, et al. KIT activation is a ubiquitous feature of gastrointestinal stromal tumors. *Cancer Res* 2001; 61: 8118-8121.

Samuels Y, Wang Z, Bardelli A, Silliman N, Ptak J, Szabo S, et al. High frequency of mutations of the PIK3CA gene in human cancers. *Science* 2004; 304: 554.

Samuels Y, Diaz LA Jr, Schmidt-Kittler O, Cummins JM, Delong L, Cheong I, et al. Mutant PIK3CA promotes cell growth and invasion of human cancer cells. *Cancer Cell* 2005; 7: 561-573.

Sánchez-Céspedes M, Parrella P, Esteller M, Nomoto S, Trink B, Engles JM, et al. Inactivation of LKB1/STK11 is a common event in adenocarcinomas of the lung. *Cancer Res* 2002; 62: 3659-3662.

Sánchez-Céspedes M. Dissecting the genetic alterations implicated in lung carcinogenesis. *Lung Cancer* 2003; 40: 111-121.

Sandler A, Gray R, Perry MC, Brahmer J, Schiller JH, Dowlati A, et al. Paclitaxel-carboplatin alone or with bevacizumab for non-small cell lung cancer. *N Engl J Med* 2006; 355: 2542-2550.

Santarius T, Shipley J, Brewer D, Stratton MR, Cooper CS. A census of amplified and overexpressed human cancer genes. *Nat Rev Cancer*. 2010; 10: 59-64.

Sartore-Bianchi A, Martini M, Molinari F, Veronese S, Nichelatti M, Artale S, et al. PIK3CA mutations in colorectal cancer are associated with clinical resistance to EGFR targeted monoclonal antibodies. *Cancer Res* 2009; 69: 1851-1857.

Sasaki H, Shimizu S, Endo K, Takada M, Kawahara M, Tanaka H, et al. EGFR and erbB2 mutation status in Japanese lung cancer patients. *Int J Cancer* 2006; 118: 180-184.

Sauter G, Lee J, Bartlett JM, Slamon DJ, Press MF. Guidelines for human epidermal growth factor receptor 2 testing: biologic and methodologic considerations. *J Clin Oncol* 2009; 27:1323–1333.

Sawyers CL. The cancer biomarker problem. *Nature* 2008; 452: 548-552.

Sawyers CL. Translational research: are we on the right track? *J Clin Invest* 2008; 118: 3798-3801.

Scagliotti GV, Parikh P, von Pawel J, Biesma B, Vansteenkiste J, Manegold C, et al. Phase III study comparing cisplatin plus gemcitabine with cisplatin plus pemetrexed in chemotherapy-naïve patients with advanced-stage non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol* 2008; 26: 3543-3551.

Schena M, Shalon D, Heller R, Chai A, Brown PO, Davis RW. Parallel human genome analysis: microarray-based expression monitoring of 1000 genes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93: 10614-10619.

Schiller JH, Akerley WL, Brugger W, Ferrari D, Garmey EG, Gerber DE, et al. Results from ARQ 197-209: A global randomized placebo-controlled phase II clinical trial of erlotinib plus ARQ 197 versus erlotinib plus placebo in previously treated EGFR inhibitor-naïve patients with locally advanced or metastatic non-small cell lung cancer (NSCLC). *J Clin Oncol* 2010; 28 (suppl): abstr LBA7502.

Scholl C, Fröhling S, Dunn IF, Schinzel AC, Barbie DA, Kim SY, et al. Synthetic lethal interaction between oncogenic KRAS dependency and STK33 suppression in human cancer cells. *Cell* 2009; 137: 821-834.

Sekido, Y., Fong, K.W. and Minna, J.D. Progress in understanding the molecular pathogenesis of human lung cancer. *Biochim. Biophys Acta* 1998; 1378: 21-59.

Sequist LV, Martins RG, Spigel D, Grunberg SM, Spira A, Jänne PA, et al. First-line gefitinib in patients with advanced non-small-cell lung cancer harboring somatic EGFR mutations. *J Clin Oncol* 2008; 26: 2442-2449.

Sequist LV, Engelman JA, Lynch TJ. Toward noninvasive genomic screening of lung cancer patients. *J Clin Oncol* 2009; 27: 2589-2591.

Sequist LV, Besse B, Lynch TJ, Miller VA, Wong KK, Gitlitz B, et al. Neratinib, an irreversible pan-ErbB receptor tyrosine kinase inhibitor: results of a phase II trial in patients with advanced non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol* 2010; 28: 3076-3083.

Shah RB, Kunju LP, Shen R, LeBlanc M, Zhou M, Rubin MA. Usefulness of basal cell cocktail (34betaE12 + p63) in the diagnosis of atypical prostate glandular proliferations. *Am J Clin Pathol* 2004; 122: 517-523.

Sharma SV, Bell DW, Settleman J, Harber DA. Epidermal growth factor receptor mutations in lung cancer. *Nat Rev Cancer* 2007; 7: 169-181.

Sharma SV, Haber DA, Settleman J. Cell line-based platforms to evaluate the therapeutic efficacy of candidate anticancer agents. *Nat Rev Cancer* 2010; 10: 241-53.

Shedden K, Taylor JM, Enkemann SA, Tsao MS, Yeatman TJ, Gerald WL, et al. Gene expression-based survival prediction in lung adenocarcinoma: a multi-site, blinded validation study. *Nat Med* 2008; 14: 822-827.

Shayesteh L, Lu Y, Kuo WL, Baldocchi R, Godfrey T, Collins C, et al. PIK3CA is implicated as an oncogene in ovarian cancer. *Nat Genet* 1999; 21: 99-102.

Sheikh HA, Fuhrer K, Cieply K, Yousem S. P63 expression in assessment of bronchioloalveolar proliferations of the lung. *Mod Pathol* 2004; 17: 1134-1140.

Shepherd FA, Rodrigues Pereira J, Ciuleanu T, Tan EH, Hirsh V, Thongprasert S, et al. Erlotinib in previously treated non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med* 2005; 353: 123-132.

Shepherd FA, Tsao MS. Epidermal growth factor receptor biomarkers in non-small-cell lung cancer: a riddle, wrapped in a mystery, inside an enigma. *J Clin Oncol* 2010; 28: 903-905.

Shigematsu H, Lin L, Takahashi T, Nomura M, Suzuki M, Wistuba II, et al. Clinical and biological features associated with epidermal growth factor receptor gene mutations in lung cancers. *J Natl Cancer Inst* 2005; 97: 339-346.

Shiraishi M, Noguchi M, Shimosato Y, Sekiya T. Amplification of protooncogenes in surgical specimens of human lung carcinomas. *Cancer Res* 1989; 49: 6474-6479.

Sidransky D. Emerging molecular markers of cancer. *Nature Rev Cancer* 2002; 2: 210-219.

Simon R, Radmacher MD, Dobbin K, McShane LM. Pitfalls in the use of DNA microarray data for diagnostic and prognostic classification. *J Natl Cancer Inst* 2003; 95: 14-18.

Simonetti S, Molina MA, Queralt C, de Aguirre I, Mayo C, Bertran-Alamillo J, et al. Detection of EGFR mutations with mutation-specific antibodies in stage IV non-small-cell lung cancer. *J Transl Med* 2010; 8:135.

Slamon DJ, Godolphin W, Jones LA, Holt JA, Wong SG, Keith DE, et al. Studies of the HER-2/neu proto-oncogene in human breast and ovarian cancer. *Science* 1989; 244: 707-712.

Slamon DJ, Leyland-Jones B, Shak S, Fuchs H, Paton V, Bajamonde A, et al. Use of chemotherapy plus a monoclonal antibody against HER2 for metastatic breast cancer that overexpresses HER2. *N Engl J Med* 2001; 344: 783-792.

Sledge GW. What is targeted therapy? *J Clin Oncol* 2005; 23: 1614-1616.

Soda M, Choi YL, Enomoto M, Takada S, Yamashita Y, Ishikawa S, et al. Identification of the transforming EML4-ALK fusion gene in non-small-cell lung cancer. *Nature* 2007; 448: 561-566.

Solit DB, Garraway LA, Pratilas CA, Sawai A, Getz G, Basso A, et al. BRAF mutation predicts sensitivity to MEK inhibition. *Nature* 2006; 439: 358-362.

Sos ML, Koker M, Weir BA, Heynck S, Rabinovsky R, Zander T, et al. PTEN loss contributes to erlotinib resistance in EGFR-mutant lung cancer by activation of Akt and EGFR. *Cancer Res* 2009; 69: 3256-3261.

Sos ML, Fischer S, Ullrich R, Peifer M, Heuckmann JM, Koker M, et al. Identifying genotype-dependent efficacy of single and combined PI3K- and MAPK-pathway inhibition in cancer. *Proc Natl Acad Sci USA* 2009; 106: 18351-18356.

Sos ML, Michel K, Zander T, Weiss J, Frommolt P, Peifer M, et al. Predicting drug susceptibility of non-small cell lung cancers based on genetic lesions. *J Clin Invest* 2009; 119: 1727-1740.

Spigel DR, Ervin TJ, Ramlau R, Daniel DB, Goldschmidt JH, Krzakowski M, et al. Randomized multicenter double blind placebo controlled phase II study evaluating MetMAb, an antibody to Met receptor, in combination with erlotinib, in patients with advanced non-small-cell lung cancer. *Ann Oncol* 2010; 21: abstr LBA5146.

Stinchcombe TE, Grilley-Olson JE, Socinski MA. If histology matters... *J Clin Oncol* 2010; 28: 1810-1812.

Sweet-Cordero A, Mukherjee S, Subramanian A, You H, Roix JJ, Ladd-Acosta C, et al. An oncogenic KRAS2 expression signature identified by cross-species gene-expression analysis. *Nat Genet* 2005; 37: 48-55.

Takahashi T, Nau MM, Chiba I, Birrer MJ, Rosenberg RK, Vinocour M, et al. p53: a frequent target for genetic abnormalities in lung cancer. *Science* 1989; 246: 491-494.

Takeuchi T, Tomida S, Yatabe Y, Kosaka T, Osada H, Yanagisawa K, et al. Expression profile-defined classification of lung adenocarcinoma shows close relationship with underlying major genetic changes and clinicopathologic behaviors. *J Clin Oncol* 2006; 24: 1679-1688.

Tan D, Li Q, Deeb G, Ramnath N, Slocum HK, Brooks J, et al. Thyroid transcription factor-1 expression prevalence and its clinical implications in non-small cell lung cancer: a high-throughput tissue microarray and immunohistochemistry study. *Hum Pathol* 2003; 34: 597-604.

Tang JM, He QY, Guo RX, Chang XJ. Phosphorylated Akt overexpression and loss of PTEN expression in non-small cell lung cancer confers poor prognosis. *Lung Cancer* 2006; 51: 181-191.

Tang Z, Du R, Jiang S, Wu C, Barkauskas DS, Richey J, et al. Dual MET-EGFR combinatorial inhibition against T790M-EGFR-mediated erlotinib-resistant lung cancer. *Br J Cancer* 2008; 99: 911-922.

Taniguchi K, Okami J, Kodama K, Higashiyama M, Kato K. Intratumor heterogeneity of epidermal growth factor receptor mutations in lung cancer and its correlation to the response to gefitinib. *Cancer Sci* 2008; 99: 929-935.

Tanizaki J, Okamoto I, Okamoto K, Takezawa K, Kuwata K, Yamaguchi H, et al. MET tyrosine kinase inhibitor crizotinib (PF-02341066) shows differential antitumor effects in non-small cell lung cancer according to MET alterations. *J Thorac Oncol* 2011; 6: 1624-1631.

ten Bosch JR, Grody WW. Keeping up with the next generation: massively parallel sequencing in clinical diagnostics. *J Mol Diagn* 2008; 10: 484-492.

Terry J, Leung S, Laskin J, Leslie KO, Gown AM, Ionescu DN. Optimal immunohistochemical markers for distinguishing lung adenocarcinomas from squamous cell carcinomas in small tumor samples. *Am J Surg Pathol* 2010; 34: 1805-1811.

Thatcher N, Chang A, Parikh P, Rodrigues Pereira J, Ciuleanu T, von Pawel J, et al. Gefitinib plus best supportive care in previously treated patients with refractory advanced non-small-cell lung cancer: results from a randomised, placebo-controlled, multicentre study (Iressa Survival Evaluation in Lung Cancer). *Lancet* 2005; 366: 1527-1537.

Thelwell N, Millington S, Solinas A, Booth J, Brown T. Mode of action and application of Scorpion primers to mutation detection. *Nucleic Acids Res* 2000; 28: 3752-3761.

Tracey L, Villuendas R, Ortíz P, Dopazo A, Spiteri I, Lombardia L, et al. Identification of genes involved in resistance to interferon- $\alpha$  in cutaneous T-cell lymphoma. *Am J Pathol* 2002; 161: 1825-1837.

Travis WD, Brambilla E, Müller-Hermelink HK and Harris CC, editors. World Health Organization Classification of Tumours. Pathology and Genetics of Tumours of the Lung, Pleura, Thymus and Heart. Lyon: IARC Press; 2004.

Travis WD, Rekhtman N, Riley GJ, Geisinger KR, Asamura H, Brambilla E, et al. Pathologic diagnosis of advanced lung cancer based on small biopsies and cytology: a paradigm shift. *J Thorac Oncol*. 2010; 5: 411-414.

Travis WD, Brambilla E, Noguchi M, Nicholson AG, Geisinger KR, Yatabe Y, et al. International association for the study of lung cancer/american thoracic society/european respiratory society international multidisciplinary classification of lung adenocarcinoma. *J Thorac Oncol* 2011; 6: 244-285.

Tsao MS, Sakurada A, Cutz JC, Zhu CQ, Kamel-Reid S, Squire J, et al. Erlotinib in lung cancer molecular and clinical predictors of outcome. *N Engl J Med* 2005; 353: 133-144.

Tubbs RR, Hicks DG, Cook J, Downs-Kelly E, Pettay J, Hartke MB, et al. Fluorescence in situ hybridization (FISH) as primary methodology for the assessment of HER2 Status in adenocarcinoma of the breast: a single institution experience. *Diagn Mol Pathol* 2007; 16: 207-210.

Turke AB, Zejnullahu K, Wu YL, Song Y, Dias-Santagata D, Lifshits E, et al. Preexistence and clonal selection of MET amplification in EGFR mutant NSCLC. *Cancer Cell* 2010; 17: 77-88.

Tursz T, Andre F, Lazar V, Lacroix L, Soria JC. Implications of personalized medicine-perspective from a cancer center. *Nat Rev Clin Oncol* 2011; 8: 177-183.

Ullmann R, Morbini P, Halbwedl I, Bongiovanni M, Gogg-Kammerer M, Papotti M, et al. Protein expression profiles in adenocarcinomas and squamous cell carcinomas of the lung generated using tissue microarrays. *J Pathol* 2004; 203: 798-807.

Van Cutsem E, Köhne CH, Hitre E, Zaluski J, Chang Chien CR, Makhson A et al. Cetuximab and chemotherapy as initial treatment for metastatic colorectal cancer. *N Engl J Med* 2009; 360: 1408-1417.

Vaquerizas JM, Dopazo J, Díaz-Uriarte R. DNMAID: web-based diagnosis and normalization for microarray data. *Bioinformatics* 2004; 20: 3656-3658.

Velculescu VE, Zhang L, Vogelstein B, Kinzler KW. Serial analysis of gene expression. *Science* 1995; 270: 484-487.

Von Hoff DD, Stephenson JJ Jr, Rosen P, Loesch DM, Borad MJ, Anthony S, et al. Pilot study using molecular profiling of patients' tumors to find potential targets and select treatments for their refractory cancers. *J Clin Oncol* 2010; 28: 4877-4883.

Weil RJ. Incorporating molecular tools into early-stage clinical trials. *PLoS Medicine* 2008; 5: e21.

Weinstein IB, Joe A. Oncogene addiction. *Cancer Res* 2008; 68: 3077-3080.



Weir BA, Woo MS, Getz G, Perner S, Ding L, Beroukhi R, et al. Characterizing the cancer genome in lung adenocarcinoma. *Nature* 2007; 450: 893-898.

Weiss J, Sos ML, Seidel D, Peifer M, Zander T, Heuckmann JM, et al. Frequent and focal FGFR1 amplification associates with therapeutically tractable FGFR1 dependency in squamous cell lung cancer. *Sci Transl Med* 2010; 2: 62ra93.

Werling RW, Hwang H, Yaziji H, Gown AM. Immunohistochemical distinction of invasive from noninvasive breast lesions: a comparative study of p63 versus calponin and smooth muscle myosin heavy chain. *Am J Surg Pathol* 2003; 27: 82-90.

Westra WH, Slebos RJ, Offerhaus GJ, Goodman SN, Evers SG, Kensler TW, et al. K-ras oncogene activation in lung adenocarcinomas from former smokers. Evidence that K-ras mutations are an early and irreversible event in the development of adenocarcinoma of the lung. *Cancer* 1993; 72: 432-438.

Whitcombe D, Theaker J, Guy SP, Brown T, Little S. Detection of PCR products using self-probing amplicons and fluorescence. *Nature Biotechnol* 1999, 17: 804-807.

Whitehall V, Tran K, Umapathy A, Grieco F, Hewitt C, Evans TJ, et al. A multicenter blinded study to evaluate KRAS mutation testing methodologies in the clinical setting. *J Mol Diagn* 2009; 11: 543-552.

Wigle DA, Jurisica I, Radulovich N, Pintilie M, Rossant J, Liu N, et al. Molecular profiling of non-small cell lung cancer and correlation with disease-free survival. *Cancer Res* 2002; 62: 3005-3008.

Winton T, Livingston R, Johnson D, Rigas J, Johnston M, Butts C, et al. Vinorelbine plus cisplatin vs. observation in resected non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med* 2005; 352: 2589-2597.

Wistuba II, Gelovani JG, Jacoby JJ, Davis SE, Herbst RS. Methodological and practical challenges for personalized cancer therapies. *Nat Rev Clin Oncol* 2011; 8: 135-141.

Workman P, de Bono J. Targeted therapeutics for cancer treatment: major progress towards personalised molecular medicine. *Curr Opin in Pharmacol* 2008; 8: 359-362.

Wu M, Wang B, Gil J, Sabo E, Miller L, Gan L, Burstein DE. P63 and TTF-1 immunostaining. A useful marker panel for distinguishing small cell carcinoma of lung from poorly differentiated squamous cell carcinoma of lung. *Am J Clin Pathol* 2003; 119: 696-702.

Xie Y, Minn JD. Predicting the future for people with lung cancer. *Nature Med* 2008; 14: 812-813.

Yamagata N, Shyr Y, Yanagisawa K, Edgerton M, Dang TP, Gonzalez A, et al. A training-testing approach to the molecular classification of resected non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res* 2003; 9: 4695-4704.

Yamamoto H, Shigematsu H, Nomura M, Lockwood WW, Sato M, Okumura N, et al. PIK3CA mutations and copy number gains in human lung cancers. *Cancer Res* 2008; 68: 6913-6921.

Yamamoto S, Tsuda H, Miyai K, Takano M, Tamai S, Matsubara O. Gene amplification and protein overexpression of MET are common events in ovarian clear-cell adenocarcinoma: their roles in tumor progression and prognostication of the patient. *Mod Pathol* 2011; 24: 1146-1155.

Yang H, Higgins B, Kolinsky K, Packman K, Go Z, Iyer R, et al. RG7204 (PLX4032), a selective BRAF V600E inhibitor, displays potent antitumor activity in preclinical melanoma models. *Cancer Res* 2010; 70: 5518-5527.

Yasuda H, Kobayashi S, Costa DB. EGFR exon 20 insertion mutations in non-small-cell lung cancer: preclinical data and clinical implications. *Lancet Oncol* 2011, doi: 10.1016/S1470-2045(11)70129-2. [Epub ahead of print]

Yatabe Y, Kosaka T, Takahashi T, Mitsudomi T. EGFR mutation is specific for terminal respiratory unit type adenocarcinoma. *Am J Surg Pathol* 2005; 29: 633-639.

Yeatman TJ. Predictive biomarkers: identification and verification. *J Clin Oncol* 2009; 27: 2743-2744.

Yokoi S, Yasui K, Iizasa T, Imoto I, Fujisawa T, Inazawa J. TERC identified as a probable target within the 3q26 amplicon that is detected frequently in non-small cell lung cancers. *Clin Cancer Res* 2003; 9: 4705-4713.

Yokomizo A, Tindall DJ, Drabkin H, Gemmill R, Franklin W, Yang P, et al. PTEN/MMAC1 mutations identified in small cell, but not in non-small cell lung cancers. *Oncogene* 1998; 17: 475-479.

Yu J, Kane S, Wu J, Benedettini E, Li D, Reeves C, et al. Mutation-specific antibodies for the detection of EGFR mutations in non-small-cell lung cancer. *Clin Cancer Res* 2009; 15: 3023-3028.

Zha J, O'Brien C, Savage H, Huw LY, Zhong F, Berry L, et al. Molecular predictors of response to a humanized anti-insulin-like growth factor-I receptor monoclonal antibody in breast and colorectal cancer. *Mol Cancer Ther* 2009; 8: 2110-2121.

Zhong L, Goldberg MS, Parent ME, Hanley JA. Exposure to environmental tobacco smoke and the risk of lung cancer: a meta-analysis. *Lung Cancer* 2000; 27: 3-18.

Zhou C, Ni J, Zhao Y, Su B. Rapid detection of epidermal growth factor receptor mutations in non-small cell lung cancer using real-time polymerase chain reaction with TaqMan-MGB probes. *Cancer J* 2006; 12: 33-39.

Zhou Q, Zhang XC, Chen ZH, Yin XL, Yang JJ, Xu CR, et al. Relative abundance of EGFR mutations predicts benefit from gefitinib treatment for advanced non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol* 2011; 29: 3316-3321.

Zhu CQ, da Cunha Santos G, Ding K, Sakurada A, Cutz JC, Liu N, et al; National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group Study BR.21. Role of KRAS and EGFR as biomarkers of response to erlotinib in National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group Study BR.21. *J Clin Oncol* 2008; 26: 4268-4275.

## **APÉNDICES**



**Apéndice A. Clasificación de tumores de pulmón.** Se muestra la clasificación de los tumores de pulmón de acuerdo con la última clasificación de la Organización Mundial de la Salud, OMS, (Travis et al., 2004), así como la más reciente revisión propuesta para los adenocarcinomas de pulmón (Travis et al., 2011)

TUMORES EPITELIALES MALIGNOS	TUMORES EPITELIALES BENIGNOS
Lesiones preinvasivas <ul style="list-style-type: none"> <li>Carcinoma epidermoide in situ</li> <li>Hiperplasia adenomatosa atípica</li> <li>Hiperplasia neuroendocrina idiopática difusa</li> </ul>	Papiloma <ul style="list-style-type: none"> <li>Escamoso</li> <li>Glandular</li> <li>Mixto escamoso/glandular</li> </ul>
Carcinoma epidermoide <ul style="list-style-type: none"> <li>Papilar</li> <li>Carcinoma epidermoide de células claras</li> <li>Carcinoma epidermoide de células pequeñas</li> <li>Basaloide</li> </ul>	Adenoma <ul style="list-style-type: none"> <li>Alveolar</li> <li>Papilar</li> <li>Tipo glándula</li> </ul>
Adenocarcinoma <ul style="list-style-type: none"> <li>Mixto</li> <li>Acinar</li> <li>Papilar</li> <li>Bronquioloalveolar               <ul style="list-style-type: none"> <li>No mucinoso</li> <li>Mucinoso</li> <li>Mixto mucinoso/no mucinoso</li> </ul> </li> <li>Sólido con formación de mucina</li> <li>Fetal</li> <li>Carcinoma mucinoso (coloide)</li> <li>Cistoadenocarcinoma mucinoso</li> <li>Adenocarcinoma de células en anillo de sello</li> <li>Adenocarcinoma de células claras</li> </ul>	<b>TUMORES MESENQUIMALES</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>Hemangioendotelioma epiteloide</li> <li>Angiosarcoma</li> <li>Blastoma pleuropulmonar</li> <li>Condroma</li> <li>Tumor miofibroblástico peribronquial congénito</li> <li>Linfangiomatosis pulmonar difusa</li> <li>Tumor miofibroblástico inflamatorio</li> <li>Linfangioleiomiomatosis</li> <li>Sarcoma sinovial               <ul style="list-style-type: none"> <li>Monofásico</li> <li>Bifásico</li> </ul> </li> <li>Sarcoma de arteria pulmonar</li> <li>Sarcoma de vena pulmonar</li> </ul>
Carcinoma adenoescamoso	<b>TUMORES LINFOPROLIFERATIVOS</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>Linfoma marginal</li> <li>Linfoma B difuso de células grandes</li> <li>Granulomatosis linfomatoide</li> <li>Histiocitosis de células de Langerhans</li> </ul>
Carcinoma sarcomatoide <ul style="list-style-type: none"> <li>Carcinoma pleomórfico</li> <li>Carcinoma de células fusiformes</li> <li>Carcinoma de células gigantes</li> <li>Carcinosarcoma</li> <li>Blastoma pulmonar</li> </ul>	<b>MISCELÁNEA</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>Hematoma</li> <li>Hemangioma esclerosante</li> <li>Tumor de células claras</li> <li>Tumor de células germinales</li> </ul>
Carcinoma de células pequeñas <ul style="list-style-type: none"> <li>Carcinoma de células pequeñas combinado</li> </ul>	
Tumor carcinoide <ul style="list-style-type: none"> <li>Carcinoide típico</li> <li>Carcinoma atípico</li> </ul>	
Tumores de glándula salivar <ul style="list-style-type: none"> <li>Carcinoma mucoepidermoide</li> <li>Carcinoma adenoides quístico</li> <li>Carcinoma epi-mioepitelial</li> </ul>	

Clasificación OMS de tumores de pulmón (*adaptada a partir de Travis et al., 2004*)

## Apéndice A. Clasificación de tumores de pulmón. (Continuación).

---

### LESIONES PREINVASIVAS

- Hiperplasia adenomatosa atípica
- Adenocarcinoma in situ ( $\leq 3$ cm, antiguo adenocarcinoma bronquioloalveolar)
  - No mucinoso
  - Mucinoso
  - Mixto mucinoso/no mucinoso

### ADENOCARCINOMA MÍNIMAMENTE INVASIVO (tumor con predominio lepidico de tamaño $\leq 3$ cm que invade $\leq 5$ mm)

- No mucinoso
- Mucinoso
- Mixto mucinoso/no mucinoso

### ADENOCARCINOMA INVASIVO

- De patrón predominantemente lepidico (antiguo adenocarcinoma bronquioloalveolar no mucinoso, que invade  $> 5$ mm)
- De patrón predominantemente acinar
- De patrón predominantemente papilar
- De patrón predominantemente micropapilar
- De patrón predominantemente sólido con formación de mucina

### VARIANTES DE ADENOCARCINOMA INVASIVO

- Adenocarcinoma invasivo mucinoso (antiguo adenocarcinoma bronquioloalveolar mucinoso)
  - Coloide
  - Fetal (alto y bajo grado)
  - Entérico
- 

Clasificación de los adenocarcinomas de pulmón (*adaptada a partir de Travis et al., 2011*)

**Apéndice B. Genes diferencialmente expresados entre SCCs y ACs con un FDR  $\leq 0.0005$ .** Se indica el nivel medio de expresión de los genes seleccionados en cada tipo histológico así como la relación entre su expresión en ambos grupos (SCC *versus* AC)

Nombre	Gene Bank Accession No.	Descripción	SCC	AC	Relación expresión SCC vs AC
ABCC6	AA779212	ATP-binding cassette, sub-family C (CFTR/MRP), member 6	0.9	2.2	0.4
APOD	H15842	Apolipoprotein D	3.5	1.2	3.0
ATP1B3	R35219	ATPase, Na <sup>+</sup> /K <sup>+</sup> transporting, beta 3 polypeptide	2.4	0.8	2.9
BICD2	AA279081	Bicaudal D homolog 2 (Drosophila)	2.5	1.0	2.4
CACNA1D	N62240	Calcium channel, voltage-dependent, L type, alpha 1D subunit	0.6	1.0	0.6
CRIP2	AW245272	Cysteine-rich protein 2	1.3	3.8	0.3
CSTA	W72207	Cystatin A (stefin A)	37.0	3.3	11.0
EIF5A2	BM681529	Eukaryotic translation initiation factor 5A2	1.5	0.7	2.2
FST	AA701860	Follistatin	0.5	0.1	5.6
HPN	H62162	Hepsin (transmembrane protease, serine 1)	0.6	2.6	0.23
JAG1	R70685	Jagged 1 (Alagille syndrome)	4.1	0.9	4.5
KRT17	H44051	Keratin 17 (epidermolysis bullosa simplex, Dowling-Meara,	26.0	2.0	13.0
KRT5	AA160507	Keratin 5 (epidermolysis bullosa simplex, Dowling-Meara/Kobner/Weber-Cockayne types)	20.0	1.8	11.0
LRBA	AA041499	LPS-responsive vesicle trafficking, beach and anchor	0.9	1.5	0.6
PAM	R34877	Peptidylglycine alpha-amidating monooxygenase	0.8	1.9	0.4
PIK3CA	W72473	Phosphoinositide-3-kinase, catalytic, alpha polypeptide	2.2	1.1	2.0
PKP1	AI081358	Plakophilin 1 (ectodermal dysplasia/skin fragility syndrome)	27.0	1.0	27.0
PTPRZ1	AA476460	Protein tyrosine phosphatase, receptor-type, Z polypeptide 1	3.2	0.4	8.0
QSCN6	AA464152	Quiescin Q6	0.7	2.1	0.3
TP73L	AA455929	Tumor protein p73-like	37.0	2.1	18.0
TRIM29	AA055486	Tripartite motif-containing 29	9.2	0.9	10.0
BMP7	W73473	Bone morphogenetic protein 7 (osteogenic protein 1)	2.3	0.5	5.0
FGF12	H19129	Fibroblast growth factor 12	2.4	0.9	2.6
PTPN5	H29627	Protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 5 (striatum-	3.6	1.0	3.7
SLC6A8	AA047465	Solute carrier family 6 (neurotransmitter transporter, creatine),	1.1	0.3	4.0
SNAI2	H57309	Snail homolog 2 (Drosophila)	2.0	0.8	2.3
TM4SF8	AA287196	Tetraspanin 3	1.3	2.4	0.6
TPD52L1	AI014441	Tumor protein D52-like 1	2.0	0.7	2.9
UGT1A6	T70999	UDP glucuronosyltransferase 1 family, polypeptide A9	19.0	3.5	5.4
ABCC5	N80617	ATP-binding cassette, sub-family C (CFTR/MRP), member 5	3.1	0.9	3.4
CTNNA1	AA676957	Leucine rich repeat transmembrane neuronal 2	0.8	1.3	0.6
DNALI1	AA447593	Dynein, axonemal, light intermediate polypeptide 1	1.8	7.0	0.3
ERBB3	AA877334	V-erb-b2 erythroblastic leukemia viral oncogene homolog 3	0.5	1.4	0.4
NFE2L2	H88359	Nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2	2.6	1.2	2.2
RIS1	AA127069	Ras-induced senescence 1	0.2	0.1	2.9
SLC2A1	AA679565	Solute carrier family 2 (facilitated glucose transporter),	2.8	0.7	4.0
SPRR1B	AA447835	Small proline-rich protein 1B (cornifin)	17.0	1.9	9.0
TLE2	AA873564	Transducin-like enhancer of split 2 (E(sp1) homolog,	1.2	2.1	0.6
AP2M1	BE208088	Adaptor-related protein complex 2, mu 1 subunit	1.4	0.8	1.9
CNTN5	R25901	Contactin 5	1.8	1.2	1.6
UBE2S	AA464729	Ubiquitin-conjugating enzyme E2S	1.0	0.5	1.9
BCL11A	AA971704	B-cell CLL/lymphoma 11A (zinc finger protein)	2.3	1.2	1.9
ARSE	AA705395	Arylsulfatase E (chondrodysplasia punctata 1)	0.6	1.8	0.3
CD44	W45275	CD44 antigen (homing function and Indian blood group	1.1	0.6	1.9



**Apéndice B. Genes diferencialmente expresados entre SCCs y ACs con un FDR  $\leq 0.0005$ .**  
 (Continuación)

Nombre	Gene Bank Accession No.	Descripción	SCC	AC	Relación expresión SCC vs AC
KCTD15	AA133665	Potassium channel tetramerisation domain containing 15	1.2	0.7	1.8
ZNF76	AA626012	Zinc finger protein 76 (expressed in testis)	0.8	1.3	0.7
ALDH3A1	AI652557	Aldehyde dehydrogenase 3 family, member A1	15.0	1.3	11.0
DMRT2	W93861	Doublesex and mab-3 related transcription factor 2	5.3	1.4	4.0
DSC3	R32665	Desmocollin 3	26.0	1.3	20.0
PVRL1	AA911971	Hypothetical protein MGC16207	2.9	1.2	2.5
GJB2	AA490688	Gap junction protein, beta 2, 26kDa (connexin 26)	7.6	2.0	4.0
ACTL6A	AA410394	Actin-like 6A	1.7	0.8	2.1
PTH1H	AA845432	Parathyroid hormone-like hormone	6.4	1.3	5.0
SPRR2C	AA399674	Small proline-rich protein 2C	14.0	1.7	8.0
UFD1L	BE729162	Ubiquitin fusion degradation 1 like (yeast)	0.9	0.6	1.7
KLF5	BE900572	Kruppel-like factor 5 (intestinal)	0.7	0.4	1.9
UMPS	AW410965	Uridine monophosphate synthetase (orotate phosphoribosyl transferase and orotidine-5'-decarboxylase)	1.8	0.9	1.9
EDG8	N47089	Endothelial differentiation, sphingolipid G-protein-coupled receptor, 8	3.0	1.3	2.2
GALE	AA281030	UDP-galactose-4-epimerase	0.7	1.5	0.5
T3JAM	BM680056	TRAF3 interacting protein 3	1.6	0.9	1.8
GPX2	AA135289	Glutathione peroxidase 2 (gastrointestinal)	8.1	1.7	5.0
GSK3B	BE257061	Glycogen synthase kinase 3 beta	1.2	0.8	1.6
CAS1	AA969799	O-acetyltransferase	0.9	1.6	0.5
CD63	H09008	CD63 antigen (melanoma 1 antigen)	1.2	2.2	0.6
SYNE1	AA046724	Spectrin repeat containing, nuclear envelope 1	1.5	2.7	0.6
LTB4R2	R63368	Leukotriene B4 receptor 2	1.7	1.1	1.6
RORC	AI052192	RAR-related orphan receptor C	1.0	1.7	0.6
CSDA	AA465019	Cold shock domain protein A	1.0	0.5	2.0
RFC4	N93924	Replication factor C (activator 1) 4, 37kDa	1.0	0.5	2.0
KCMF1	AA436378	Potassium channel modulatory factor 1	1.6	1.1	1.5
SPDEF	AI745526	SAM pointed domain containing ets transcription factor	0.7	2.6	0.25
IL1RN	BM929618	Interleukin 1 receptor antagonist	3.6	1.5	2.5
NTRK2	N63949	Neurotrophic tyrosine kinase, receptor, type 2	16.0	1.6	10.0
ITGA6	R43483	Integrin, alpha 6	2.6	1.0	2.6
PDCD10	BE276698	Programmed cell death 10	1.7	0.9	1.9
FGFBP1	BE563742	Fibroblast growth factor binding protein 1	26.0	3.7	7.0
GOLPH2	AA454597	Golgi phosphoprotein 2	1.3	2.5	0.5
SLC33A1	H66943	Solute carrier family 33 (acetyl-CoA transporter), member 1	1.6	1.1	1.7
PTDSS1	H28984	Phosphatidylserine synthase 1	1.1	0.6	1.8
GNS	W56627	Glucosamine (N-acetyl)-6-sulfatase (Sanfilippo disease IIID)	1.3	1.9	0.7
CEACAM1	AA411757	Carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 1 (biliary glycoprotein)	0.7	1.7	0.4
FREQ	AA135929	Frequenin homolog (Drosophila)	1.2	0.7	1.6
A2M	AA775447	Alpha-2-macroglobulin	1.3	3.6	0.3
CHCHD6	AA701291	Coiled-coil-helix-coiled-coil-helix domain containing 6	1.6	0.9	1.7
PFN2	BE266902	Profilin 2	1.6	0.6	2.7
CRYM	R67147	Crystallin, mu	1.9	7.4	0.25
HRAS	AI536679	V-Ha-ras Harvey rat sarcoma viral oncogene homolog	2.0	1.2	1.7
PSMB7	AA490863	Proteasome (prosome, macropain) subunit, beta type, 7	1.0	1.6	0.6
ELA2A	AA845015	Elastase 2A	1.6	1.3	1.3



**Apéndice B. Genes diferencialmente expresados entre SCCs y ACs con un FDR  $\leq 0.0005$ .**  
(Continuación)

Nombre	Gene Bank Accession No.	Descripción	SCC	AC	Relación expresión SCC vs AC
SH3KBP1	AA989257	SH3-domain kinase binding protein 1	0.6	1.0	0.6
HSD17B4	AA488029	Hydroxysteroid (17-beta) dehydrogenase 4	1.1	1.5	0.7
PPP1R2	AA428749	Protein phosphatase 1, regulatory (inhibitor) subunit 2	1.5	0.9	1.6
FABP5	N47717	Fatty acid binding protein 5 (psoriasis-associated)	9.8	2.0	5.0
CANX	N30157	Calnexin	0.7	1.2	0.6
SIAH2	AA029041	Seven in absentia homolog 2 (Drosophila)	1.6	1.0	1.6
POLG	BG151548	Polymerase (DNA directed), gamma	0.6	0.4	1.4
MAPK6	AA426537	Mitogen-activated protein kinase 6	1.0	0.5	1.8
IL13RA1	N73758	Interleukin 13 receptor, alpha 1	1.4	2.1	0.7
PAK2	N28496	P21 (CDKN1A)-activated kinase 2	1.0	0.6	1.6
FOLR1	BE900714	Folate receptor 1 (adult)	0.5	2.0	0.25
CKAP2	AA504130	Cytoskeleton associated protein 2	0.7	0.4	1.6
THOC3	AA599058	THO complex 3	1.6	0.8	2.0
PRKY	W24161	Protein kinase, Y-linked	2.3	1.0	2.4
IRF6	AI017342	Interferon regulatory factor 6	15.3	6.0	2.6
POLR2H	AI554561	Polymerase (RNA) II (DNA directed) polypeptide H	1.6	1.0	1.7
UCK2	W69906	Uridine-cytidine kinase 2	0.9	0.5	1.9
SCARB2	AA776891	Scavenger receptor class B, member 2	1.2	1.8	0.7
PLEKHB1	AA412417	Pleckstrin homology domain containing, family B (evectins) member 1	1.2	2.7	0.4
ORMDL3	BE268137	ORM1-like 3 (S. cerevisiae)	1.7	2.8	0.6
SEN2	AA190626	SUMO1/sentrin/SMT3 specific peptidase 2	1.4	0.8	1.7
RAB7	BX104439	RAB7, member RAS oncogene family	1.4	1.1	1.4
NUSAP1	AA779949	Nucleolar and spindle associated protein 1	0.5	0.3	1.6
DOK1	AA142943	Docking protein 1, 62kDa (downstream of tyrosine kinase 1)	1.4	1.9	0.7
GNAI1	AA406420	Guanine nucleotide binding protein (G protein), alpha inhibiting activity polypeptide 1	2.6	1.3	1.9
ABCC1	T94105	ATP-binding cassette, sub-family C (CFTR/MRP), member 1	1.2	0.4	2.9
TXNL2	H17927	Thioredoxin-like 2	1.3	0.8	1.7
HOXD13	AI858239	Homeo box D13	1.4	0.5	2.6
ARHGEF4	H22917	Rho guanine nucleotide exchange factor (GEF) 4	1.6	0.8	2.0
IL6ST	T61343	Interleukin 6 signal transducer (gp130, oncostatin M receptor)	0.6	0.9	0.6
TLE6	AI214326	Transducin-like enhancer of split 6 (E(sp1) homolog,	1.1	1.6	0.7
EHBP1	AA456284	EH domain binding protein 1	1.2	0.9	1.4
GYS1	BF027573	Glycogen synthase 1 (muscle)	1.1	0.7	1.5
DPYSL2	AA487674	Dihydropyrimidinase-like 2	0.6	1.4	0.4
BLMH	R96721	Bleomycin hydrolase	0.8	0.5	1.6
WNT5A	W93592	Wingless-type MMTV integration site family, member 5A	1.3	0.5	2.8
CGI-121	AA009629	CGI-121 protein	1.3	0.8	1.7
CD7	AW408337	CD7 antigen (p41)	0.5	0.3	1.8
CBR1	AA280924	Carbonyl reductase 1	3.9	1.5	2.6
PCDH1	T96359	Protocadherin 1 (cadherin-like 1)	1.4	3.0	0.5
RPL35A	AA873351	Ribosomal protein L35a	2.0	1.2	1.6
RHOB	R74467	Ras homolog gene family, member B	1.2	2.7	0.5
MRPL36	AA454963	Mitochondrial ribosomal protein L36	1.6	0.9	1.8
HSPC135	AA936753	HSPC135 protein	1.2	0.9	1.4
MAGED2	AI684984	Melanoma antigen family D, 2	1.0	1.6	0.6
SKP2	BE671874	S-phase kinase-associated protein 2 (p45)	0.5	0.3	1.9

**Apéndice B. Genes diferencialmente expresados entre SCCs y ACs con un FDR  $\leq 0.0005$ .**  
 (Continuación)

Nombre	Gene Bank Accession No.	Descripción	SCC	AC	Relación expresión SCC vs AC
IGSF4	N51362	Immunoglobulin superfamily, member 4	0.8	2.5	0.3
ERBB2	AA443351	V-erb-b2 erythroblastic leukemia viral oncogene homolog 2, neuro/glioblastoma derived oncogene homolog (avian)	1.1	4.6	0.24
ALOX12	T97276	Arachidonate 12-lipoxygenase	1.8	1.2	1.9
PBXIP1	AA074535	Pre-B-cell leukemia transcription factor interacting protein 1	1.6	2.9	0.6
RARRES3	W47350	Retinoic acid receptor responder (tazarotene induced) 3	4.6	12.1	0.4
ARGBP2	AA142922	Sorbin and SH3 domain containing 2	1.0	1.4	0.7
SH3GLP2	AA417252	SH3-domain GRB2-like pseudogene 2	4.7	1.1	4.3
HOXA10	AA953229	Homeo box A10	1.1	0.7	1.5
CISH	AA427521	Cytokine inducible SH2-containing protein	1.1	1.7	0.7
RARG	AA496438	Retinoic acid receptor, gamma	1.4	0.9	1.6
PRKCD	H11054	Protein kinase C, delta	1.4	2.1	0.7
FZD6	T68333	Frizzled homolog 6 (Drosophila)	1.8	0.9	2.0
ADSL	AA456400	Adenylosuccinate lyase	0.9	0.6	1.5
S100A8	BF693611	S100 calcium binding protein A8 (calgranulin A)	24.2	7.5	3.2
KEAP1	BE313472	Kelch-like ECH-associated protein 1	2.0	1.1	1.9
PHLDB2	AA479351	Pleckstrin homology-like domain, family B, member 2	2.3	0.9	2.6
KIF13B	AI033829	Kinesin family member 13B	1.4	2.1	0.7
HH114	AA130117	Hypothetical protein HH114	0.9	0.6	1.5
RGS7	H23046	Regulator of G-protein signalling 7	0.8	1.2	0.7
POLQ	AI057325	Polymerase (DNA directed), theta	0.7	0.4	1.7
WARP	AA677650	Von Willebrand factor A domain containing 1	3.1	6.2	0.5
LMNB2	BQ184514	Lamin B2	0.9	0.6	1.6
GCLC	AI360595	Glutamate-cysteine ligase, catalytic subunit	2.8	1.1	2.5
ANXA11	BM709344	Annexin A11	1.1	1.6	0.7
NPC2	AA630449	Niemann-Pick disease, type C2	2.6	8.0	0.3
ARHGEF2	AA427442	Rho/rac guanine nucleotide exchange factor (GEF) 2	0.8	1.0	0.7
PGD	AW247294	Phosphogluconate dehydrogenase	2.1	0.8	2.8
C4B	AA664406	Complement component 4B, telomeric	0.8	1.8	0.4
S100A8	BU678812	S100 calcium binding protein A8 (calgranulin A)	45.8	13.2	3.5
UNC119	AA457199	Unc-119 homolog (C. elegans)	0.7	1.0	0.7
SEPT10	AA042847	Septin 10	1.5	1.1	1.4
ARFIP1	T52363	ADP-ribosylation factor interacting protein 1 (arfaptin 1)	1.2	1.6	0.7
RCN2	AA598676	Reticulocalbin 2, EF-hand calcium binding domain	1.0	0.6	1.6
PRC1	AA449336	Protein regulator of cytokinesis 1	0.5	0.3	1.8
LHFPL1	H68596	Lipoma HMGIC fusion partner-like 1	0.7	0.5	1.4
CDK5R1	AA460466	Cyclin-dependent kinase 5, regulatory subunit 1 (p35)	1.5	0.9	1.6
S100A2	BE514982	S100 calcium binding protein A2	46.6	12.0	3.8
RAD51	BE280848	RAD51 homolog (RecA homolog, E. coli) (S. cerevisiae)	0.6	0.4	1.6
HSPA4L	AA478479	Heat shock 70kDa protein 4-like	0.9	0.6	1.6
WASPIP	AA421029	Wiskott-Aldrich syndrome protein interacting protein	1.5	1.1	1.3
MAP3K4	AA293860	Mitogen-activated protein kinase kinase kinase 4	1.1	0.8	1.4
RPS6KA2	T74714	Ribosomal protein S6 kinase, 90kDa, polypeptide 2	1.6	3.2	0.5
ZMAT1	AA016980	Zinc finger, matrin type 1	1.0	2.2	0.4
MYC	W87741	V-myc myelocytomatosis viral oncogene homolog (avian)	0.4	0.3	1.7
GALM	AI248113	Galactose mutarotase (aldose 1-epimerase)	1.0	1.2	0.8
BIN1	BE563338	Bridging integrator 1	1.0	1.8	0.6
BLM	AA903504	Bloom syndrome	0.8	0.6	1.4

**Apéndice B. Genes diferencialmente expresados entre SCCs y ACs con un FDR  $\leq 0.0005$ .**  
(Continuación)

Nombre	Gene Bank Accession No.	Descripción	SCC	AC	Relación expresión SCC vs AC
DPP4	W70234	Dipeptidylpeptidase 4 (CD26, adenosine deaminase complexing protein 2)	1.9	6.6	0.3
PPIF	AA442081	Peptidylprolyl isomerase F (cyclophilin F)	0.8	0.5	1.6
PIR	H69334	Pirin (iron-binding nuclear protein)	1.5	0.6	2.5
PKD1-like	AA973575	KIAA0319-like	0.8	1.2	0.7
KPNA4	AA995784	Karyopherin alpha 4 (importin alpha 3)	1.5	1.1	1.4
RANBP1	AA009498	RAN binding protein 1	0.7	0.4	1.6
KRT1	AA706022	Keratin 1 (epidermolytic hyperkeratosis)	2.2	1.2	1.8
RG9MTD1	AA193490	RNA (guanine-9-) methyltransferase domain containing 1	1.2	0.7	1.8
CLCA2	AI675394	Chloride channel, calcium activated, family member 2	3.3	1.7	1.9
GPCR5A	AA911832	G protein-coupled receptor, family C, group 5, member A	0.8	2.0	0.4
SPTAN1	T60235	Spectrin, alpha, non-erythrocytic 1 (alpha-fodrin)	0.7	1.0	0.6



## **ARTÍCULOS PUBLICADOS**